



MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM MEDICINA TROPICAL

Identificação de proteínas imunodominantes provenientes dos
subgêneros *Viannia* e *Leishmania* como potenciais candidatos vacinais
pan específicos no controle das leishmanioses

PRISCILIANA JESUS DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro
Setembro de 2020



MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM MEDICINA TROPICAL

PRISCILIANA JESUS DE OLIVEIRA

Identificação de proteínas imunodominantes provenientes dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* como potenciais candidatos vacinais pan-específicos no controle das leishmanioses

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fonseca Pinto

Rio de Janeiro
Setembro de 2020

FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS PARA A VERSÃO FINAL DA TESE.



**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM MEDICINA TROPICAL**

Identificação de proteínas imunodominantes provenientes dos subgêneros
Viannia e *Leishmania* como potenciais candidatos vacinais
pan específicos no controle das leishmanioses

PRISCILIANA JESUS DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Fonseca Pinto

Aprovada em: 22/09/2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Adriano Gomes da Silva – Presidente e revisor (INI - Fiocruz)

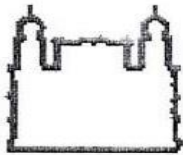
Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (IOC - Fiocruz)

Profa. Dra. Daniela de Melo Resende (Instituto René Rachou - Fiocruz)

Prof. Dr. Josué da Costa Lima Júnior - 1º suplente (IOC-Fiocruz)

Profa. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva - 2º suplente (UERJ)

Rio de Janeiro, 22 de Setembro de 2020



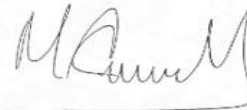
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Medicina Tropical de Prisciliana Jesus de Oliveira, sob orientação do Dr. Eduardo Fonseca Pinto. Ao vigésimo segundo dia do mês de setembro de dois mil e vinte, realizou-se às quatorze horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **“Identificação de proteínas imunodominantes provenientes dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* como potenciais candidatos vacinais pan específicos no controle das Leishmanioses”**, no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Adriano Gomes da Silva – INI/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes – IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Daniela de Melo Resende – IRR/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Josué da Costa Lima Júnior - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva - UERJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota, a Coordenadora do Programa Dr^a. Martha Cecília Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 22 de setembro de 2020.


Dr. Adriano Gomes da Silva (Presidente da Banca)

Dr^a. Martha Cecília Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):



“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima dele”. Louis Pasteur

“Óh! Profundidade da riqueza, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus!... Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre. Amém”

Paulo de Tarso, Romanos 11.33 e 36

Agradecimentos

Agradeço ao meu Deus pelos recomeços e pela vida, saúde e força para aproveitar a oportunidade de realizar este trabalho. Sou eternamente grata por tudo o que tem feito na minha vida, no seu infinito amor, durante esses dois anos.

Minha gratidão aos meus pais, a quem amo muito: Odiel de Oliveira e Priscila, Jesus de Oliveira (*in memoriam*), por tudo o que me ensinaram e que fez com que eu chegasse até aqui. Às minhas irmãs, Odilaine, Ester, Marcia, ao meu irmão Marcos, ao cunhado Joe Louis e à cunhada Jeane, por todo incentivo e às minhas sobrinhas e sobrinhos Maria Eduarda, Ana Beatriz, Victor, Bruno, Guilherme, Leonardo e Jean, que também foram grandes motivações, para eu prosseguir nessa jornada. À minha mãe do coração Vera Lúcia, pelas orações e torcida. Aos meus amigos e amigas da Aliança Bíblica Universitária do Brasil, por me ensinarem a vocação como missão e serviço. Às amigas e amigos Luciana Narcizo, Bianca Coelho Videira, Silvânia do Rosário, Marília Alves, Valesca Gonçalves, Ester Silva, Débora de Souza, Rebeca e Jônatas Fernandes, Marcos Davi Gomes de Souza, Marcio e Marcia da Hora, Cristiane Ramalho, Maria José de Oliveira, Durval de Oliveira e Renata Nascimento.

À toda equipe do LIPMED, por fazerem dessa casa um lugar de desenvolvimento científico, acadêmico, profissional e pessoal. Ao Dr. Luzinei da Silva Couto, pelo aprendizado e companheirismo, às Dra. Tayany de Deus e Andrea Saavedra e às ICs Gabriela Machado e Michelle Garcia, por toda a ajuda e amizade. À Dra. Alda, que me recebeu no laboratório e que me apoiou na decisão de fazer esse mestrado, sendo uma inspiração constante como pesquisadora.

Um agradecimento todo especial ao meu orientador, Dr Eduardo Fonseca Pinto, por acreditar no meu potencial e por me aceitar como aluna, me propondo o desafio de continuar um projeto tão importante, na sua carreira científica. Agradeço pela confiança, por todo aprendizado que me transmitiu e que pude construir, sob sua orientação. Agradeço por todo suporte, empenho, ajuda, presença e motivação que essa orientação representou pra mim. Pelo exemplo de cientista ético, competente e humano, com que pude conviver. Agradeço por tudo e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Agradeço à Dra. Patricia Cuervo Escobar, por ser mais que uma colaboradora, nos ajudando a delinear este projeto e com quem pude aprender muito. Agradeço por ser tão atenciosa com minhas dúvidas e pelo conhecimento transmitido. Por me receber tão bem, juntamente com a Dra. Nathalia Pinho, que me ajudou muito nos experimentos realizados no Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses.

Ao Dr. Álvaro Bertho e à técnica Vanessa Silva, por toda a ajuda com as frações solúveis. Ao Dr. André Ferreira, da Plataforma de Espectrometria de Massas (PDTIS-Fiocruz), pela ajuda na análise das minhas amostras. À equipe do biotério do Pav. Carlos Chagas (Fiocruz) por todo suporte e atenção.

À coordenação da PGMT, em especial à Dr. Martha Cecília Suárez Mutis, pela atenção e cuidado com todos os alunos e que foi um diferencial nesse meu percurso do mestrado. À representação discente, por transformar nossas demandas em conquistas. E à minha querida turma (2018.1), pelo compartilhar das alegrias e tensões, tornando a jornada mais leve e alegre.

Às doutoras e aos doutores que me deram a honra de suas contribuições na banca, avaliando este trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo suporte financeiro.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparação da eficácia protetora de antígenos totais de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> por via intranasal e intramuscular contra a infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i> no modelo hamster	41
Figura 2: Identificação de frações imunodominantes de antígeno solúvel de <i>L. naiffi</i> , utilizando anticorpos provenientes de amostras de soros de voluntários com cura estável da LCL	42
Figura 3: Frequência de reconhecimento das frações solúveis de <i>L. naiffi</i> por anticorpos de voluntários com cura estável da LCL	43
Figura 4.1: Fluxo de trabalho para obtenção de frações antigênicas imunodominantes de LaAg(s) e LnAg(s) e posterior análise proteômica e de bioinformática.....	45
Figura 4.2: Fluxo de trabalho para análises de bioinformática das frações imunodominantes de LaAg(s) e LnAg(s).....	46
Figura 5.1: Fracionamento de antígenos LaAg(s) e LnAg(s), por gel de eletroforese. A linha 1, define os padrões de peso molecular.	60
Figura 5.2: Identificação de proteínas presentes na faixa imunodominante dos antígenos solúveis LaAg(s) e LnAg(s).....	61
Figura 5.3: Percentual de proteínas identificadas em relação aos proteomas referência dos respectivos subgêneros – <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i> . Comparação qualitativa, considerando-se apenas a identificação das proteínas	62
Figura 5.4: Gráfico de Venn representando os grupos de proteínas identificados e validados estatisticamente nos antígenos LaAg(s) e LnAg(s). A interseção representa proteínas comuns as duas espécies	63
Figura 5.5: Principais sublocalizações celulares previstas pelos programas <i>Gene Ontology</i> e <i>Kegg</i> , para as proteínas identificadas em LaAg(s) e de LnAg(s).	65
Figura 5.6: Vias metabólicas associadas a proteínas abundantes em LaAg(s) e em LnAg(s)	66
Figura 5.7: Principais processos biológicos relacionados às proteínas das frações de LaAg(s) e de LnAg(s).	67
Figura 5.8: Funções moleculares mais expressivas, em números de proteínas, dentre as proteínas mais abundantes em LaAg(s) e em LnAg(s).....	68
Figura 5.9.A: Faixa de similaridade entre proteínas identificadas em LaAg(s) e	

proteínas humanas, de cão ou de hamster.....	70
Figura 5.9 B: Percentual de similaridade de proteínas identificadas apenas em LaAg(s) a proteínas de humanos, cão ou de hamster. <i>e-v: e-value</i>	71
Figura 5.10A: Faixa de similaridade entre proteínas apenas em LnAg(s) e proteínas de humanos, cão ou de hamster.....	72
Figura 5.10.B: Percentual de similaridade de proteínas quantificadas apenas em LnAg(s) a proteínas humanas, de cão ou de hamster.....	73
Figura 5.11A: Faixa de similaridade entre proteínas identificadas em comum em LaAg(s) e LnAg(s) e proteínas de humanos, cão ou de hamster.....	74
Figura 5.11B: Percentual de similaridade de proteínas comuns a LaAg(s) e a LnAg(s), a proteínas de humanos, de cão ou de hamster.....	75
Figura 5.12: Predição de epítomos lineares de linfócitos B, de proteínas de proteínas identificadas apenas em LaAg(s)	77
Figura 5.13: Predição de epítomos lineares de linfócitos B, de proteínas de proteínas identificadas apenas em LnAg(s)	77
Figura 5.14: Predição de epítomos lineares de linfócitos B, de proteínas de proteínas identificadas em LaAg(s) e em LnAg(s)	78
Figura 5.15: Proteínas com mais epítomos promíscuos de LaAg(s), em relação à ligação a HLA II, com base no número de alelos de HLA.	80
Figura 5.16: Proteínas com mais epítomos promíscuos identificadas apenas na fração imunodominante de LaAg(s) a antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II. Eixo x: proteínas.....	81
Figura 5.17: Proteínas com mais epítomos mais promíscuos em relação à ligação a a HLA de classe II, identificadas apenas em LnAg(s)	82
Figura 5.18. Proteínas com mais epítomos mais promíscuos identificadas apenas na fração imunodominante de LnAg(s) a antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II.	83
Figura 5.19: Proteínas mais com epítomos promíscuos de LaAg(s) e Lnag(s), com base no número de alelos de HLA II	84
Figura 5.20: Proteínas com epítomos mais promíscuos identificadas em comum nas frações imunodominantes de LaAg(s) e de LnAg(s) a antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II.	85
Figura 5.21: Dez proteínas com mais epítomos promíscuas em relação a HLA de classe I, com base no número de alelos reconhecidos. Proteínas de LaAg(s)	86
Figura 5.22: Frequência de epítomos por alelos de HLA I, de 10 proteínas mais	

promíscuas, identificadas apenas em LaAg(s) e de proteínas controles, com base no número de alelos de HLA I reconhecidos.	87
Figura 5.23: Dez proteínas com mais epítomos promíscuas, identificadas apenas em LnAg(s), com base no número de alelos reconhecidos de HLA de classe I.	88
Figura 5.24: Frequência de epítomos por alelos de HLA I, das 10 proteínas mais promíscuas, identificadas apenas em LnAg(s) e de proteínas controles, com base no número de alelos de HLA I reconhecidos.	89
Figura 5.25: Dez proteínas com mais epítomos promíscuos, quantificadas comumente em LAg(s) e em LnAg(s). Análise baseada no número de alelos reconhecidos de HLA de classe I.	90
Figura 5.26: Frequência de epítomos por alelos, das 10 proteínas com mais epítomos promíscuos, quantificadas tanto em LaAg(s) como em LnAg(s) Eixo x: proteínas. Eixo Y: Número de epítomos preditos por alelo de HLA i.....	91
Figura 5.27: Número de epítomos ligantes de HLA II (Fig.A) e de HLA I (Fig. B) de LnAg(s) e de LaAg(s).	92
Figura 5.28. Homologia de potenciais alvos vacinais proteicos para as principais espécies de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	96
Figura 7.29: Imagens obtidas pelo programa Discotope, da predição da estrutura tridimensional de proteínas modeladas, estabelecidas nesse estudo como alvos vacinais.	100

ÍNDICE DE TABELAS

Quadro 4.1: Antígenos leucocitários humanos (HLA DR, HLA DQ e HLA DP) considerados para análise de ligação de peptídeos contidos em LaAg(s) e LnAg(s)	56
Quadro 4.2: Antígenos leucocitários humanos (HLA A e HLA B), para análise de ligação de peptídeos dos antígenos LaAg(s) e LnAg(s)	57
Tabela 5.1: Dez proteínas mais abundantes nas frações imunodominantes de LaAg(s) e LnAg(s), de acordo com o valor LFQ.....	64
Tabela 5.2: Similaridade de proteínas vacinais já caracterizadas com proteínas do homem (controles de predições)	69
Tabela 5.3: Proteínas selecionadas de acordo com a abundância, baixa similaridade a proteínas humanas, número de cada um dos três tipos de epítomos preditos e com promiscuidade dos epítomos a HLA de classes I ou II....	93
Tabela 5.4: Homologia entre proteínas identificadas como potencialmente mais imunodominantes e espécies de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	97
Tabela 5.5: Proteínas selecionadas como potenciais alvos vacinais	99
Tabela 6.1: Validação experimental, reportada na literatura, de proteínas potencialmente imunodominantes, identificadas nas frações imunodominantes de LnAg(s) e LaAg(s).	124

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag85A – Antígeno 85 A

APC – células apresentadoras de antígeno, do inglês *Antigen presenting cell*

BCA - ácido biocicronínico, do inglês *bicinchoninic acid*

BLAST – Programa de alinhamento local par a par, do inglês *Basic Alignment Search Tool*

e-v - *e-value*

FDR - taxa de falsos positivos, do inglês *false discovery rate*

HLA – Antígeno leucocitário humano, do inglês *human leukocyte antigen*

ID – Identidade

IEDB - *Immune Epitope Database and Analysis Resource*

IFN – Interferon

IL – Interleucina

IM – intramuscular

IN – intranasal

LaAg - Antígeno total de *Leishmania amazonenses*

LaAg(s) - Antígeno solúvel de *Leishmania amazonenses*

LbAg – Antígeno total de *Leishmania braziliensis*

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*

LFQ – Quantificação livre de marcação, do inglês *label-free quantitation*

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LnAg - Antígeno total de *Leishmania naiffi*

LnAg(s) - Antígeno solúvel de *Leishmania naiffi*

LPMP - Lipoproteína purificada de *Mycoplasma penetrans*, do inglês *purified lipoprotein of Mycoplasma penetrans*

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose visceral

NM – Não modelada

NS - Não significativa

PBMC – células mononucleares do sangue periférico, do inglês *Peripheral blood mononuclear cell*

PBS – Solução salina tamponada com fosfato, do inglês *Phosphate buffered saline*

PDB - Banco de dados de proteínas, do inglês *Protein Data Bank*

ppm – parte por milhão

SDS PAGE – gel de eletroforese dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida, do inglês *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*

Sim – Similaridade

TAP - transportador associado ao processamento de antígeno

Th1 - Linfócitos T *helper 1*

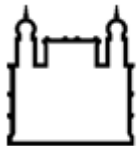
TNF – fator de necrose tumoral, do inglês *Tumor necrosis fator*

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Leishmanioses	23
1.2. Ciclo de vida do parasito	24
1.3. Manifestações clínicas	24
1.4. Epidemiologia	26
1.5. Resposta imune nas leishmanioses e o desenvolvimento de vacinas	27
1.6. Controle	31
1.7. Vacinas para leishmanioses	32
1.7.1. Vacinas de 1 ^a . geração	32
1.7.2. Vacinas de 2 ^a . geração	34
1.8. Vacinologia reversa	35
2. RACIONAL E JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos específicos	44
4. METODOLOGIA	45
4.1 Parasitos	45
4.2. Preparo dos antígenos totais e das frações solúveis	46
4.3. Fracionamento dos antígenos solúveis por SDS-PAGE	47
4.4. Digestão e dessalinização de proteínas	48
4.5. Espectrometria de massas	49
4.6. Identificação de proteínas	50
4.7. Quantificação de proteínas	51
4.8. Análise de anotação funcional	51

4.9. Análise de similaridade entre proteínas quantificadas e proteínas de mamíferos	51
4.10. Predição de epítomos lineares e não lineares reconhecidos por linfócitos B	52
4.11. Predição de epítomos reconhecidos por linfócitos T	55
4.11.1 Predição de epítomos ligantes a HLA de classe II	55
4.11.2 Predição de epítomos ligantes a HLA de classe I	57
4.12. Seleção de proteínas candidatas vacinais	58
4.13. Análise de homologia	59
5. RESULTADOS	60
5.1. Identificação proteômica e análise de bioinformática das frações imunodominantes dos antígenos LaAg(s) e LnAg(s)	60
5.1.1. Fracionamento de antígenos solúveis em gel SDS-PAGE e identificação de proteínas	60
5.1.2. Análise de abundância	62
5.2. Análise de anotação funcional.....	64
5.2.1. Sub localização celular	64
5.2.2. Vias metabólicas	65
5.2.3. Processos biológicos	66
5.2.4. Função molecular	67
5.3. Análise de similaridade	68
5.4. Análise de imunoinformática das frações de LaAg(s) e de LnAg(s).....	75
5.4.1. Predição de epítomos na fração imunodominante de LaAg(s) e LnAg(s) reconhecidos por linfócitos B	75
5.4.2. Predição de epítomos apresentados por HLA	78
5.4.2.1. Predição de epítomos apresentados por HLA II em proteínas de LaAg(s) e de LnAg(s)	78
5.4.2.2. Predição de epítomos apresentados por HLA de classe I	85
5.5. Determinação dos potenciais alvos vacinais proteicos	92
5.6. Análise de homologia dos potenciais alvos vacinais	95

6.	DISCUSSÃO.....	101
7.	CONCLUSÃO	126
8.	PERSPECTIVAS	127
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
10.	ANEXOS	
	ANEXO i Predição de epítomos lineares e não lineares de proteínas quantificadas em LaAg(s) ou em LnAg(s), reconhecidos por linfócitos B	157
	ANEXO II . Predição de epítomos de proteínas quantificadas nos antígeno LaAg(s) e LnAg(s)	163
	ANEXO III - Predição de epítomos de proteínas quantificadas nos antígeno LaAg(s) e LnAg(s).....	169



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNODOMINANTES PROVENIENTES DOS SUBGÊNEROS *VIANNIA* E *LEISHMANIA* COMO POTENCIAIS CANDIDATOS VACINAIS PAN ESPECÍFICOS NO CONTROLE DAS LEISHMANIOSES

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

PRISCILIANA JESUS DE OLIVEIRA

As leishmanioses são causadas por cerca de 20 espécies de *Leishmania* e se apresentam em diversas formas clínicas, que podem variar de branda a muito grave. Elas afetam milhões de pessoas e até então não existem medidas de controle eficazes. Assim, a imunização da população seria uma alternativa eficiente de controle. Evidências sugerem que a resposta imune que se estabelece após a cura clínica de leishmanioses deva constituir um padrão de resposta imunológica associado à proteção, e que uma preparação vacinal deveria estimulá-la preferencialmente. Nosso grupo demonstrou que antígenos de *L. (Viannia) naiffi* (espécie considerada benigna) conseguem induzir respostas bem moduladas, e que soros de voluntários curados de leishmaniose tegumentar cutânea reconheceram frações desse antígeno consideradas imunodominantes. Experimentos anteriores demonstraram em hamster que a imunização intranasal com antígenos totais dessa espécie são capazes de induzir uma imunidade protetora contra *L. (V.) braziliensis*. O mesmo grupo já havia obtido a mesma resposta protetora utilizando o antígeno total de *L. (L.) amazonensis*. No entanto, sabe-se que nem todos os componentes presentes nesses antígenos estão associados à proteção e que a identificação de proteínas que sejam imunogênicas é uma etapa indispensável na formulação de uma vacina. O objetivo deste trabalho foi identificar as proteínas imunodominantes presentes nas frações solúveis de *L. (L.) amazonensis* (LaAg(s)) e *L.(V.) naiffi* (LnAg(s)), que sejam conservadas dentro do gênero *Leishmania*, para formular uma vacina pan específica para o controle das leishmanioses. Primeiramente, os antígenos LnAg(s) e LaAg(s) foram subfracionados em gel de poli-acrilamida e as bandas com peso molecular entre 35 e 100KDa foram extraídas e submetidas à análise por espectrometria de massa para análise proteômica. Desta análise, foram obtidas as sequências de aminoácidos, o tamanho das sequências, e a abundância das proteínas.

As proteínas mais abundantes foram submetidas à análise de similaridade com proteínas de hospedeiros. As proteínas de LnAg(s) e LaAg(s) com baixa similaridade (<30%) às proteínas humanas foram analisadas por preditores de epítomos reconhecidos por linfócitos B. Em paralelo, a predição de epítomos presentes em LnAg(s) e LaAg(s), capazes de se ligar com alta afinidade a moléculas HLA classes I e II, assim como a promiscuidade de ligação a alelos de HLA para cada proteína, foram avaliados dentre aquelas que apresentaram maior abundância e baixa similaridade. Por fim, após a análise de homologia das proteínas entre as espécies de *Leishmania*, foram identificadas 11 proteínas com mais homólogos. Elas apresentaram potencial de reconhecimento por linfócitos B, assim como também por componentes da resposta imune celular (como predito para a apresentação por HLA classes I e II). O potencial de ativação de linfócitos T pelos epítomos presentes nas 11 proteínas foi incrementado pela ampla capacidade de apresentação antigênica na população humana, devido à alta promiscuidade quanto à capacidade de ligação destes epítomos a alelos de HLA. Esses resultados contribuem para a identificação de antígenos com potencial de compor um protótipo vacinal capaz de induzir uma resposta imune protetora pan específica em humanos, com características imunodominantes e indutoras de resposta humoral e celular, para serem empregados no controle das leishmanioses.

Identification of immunodominant proteins from the subgenera *Viannia* and *Leishmania* as potential pan-specific vaccine candidates in the control of Leishmaniasis

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by 20 *Leishmania* species and presents several clinical forms, which can vary from mild to very severe. They affect millions of people and so far there are no effective control measures. Thus, the immunization of population would be an efficient control alternative. Some evidence suggests that the immune response that is established after the long-lasting clinical cure of leishmaniasis should constitute an immune response pattern associated with protection, and that a vaccine preparation should preferably stimulate this immune profile. Our group showed that *L. (Viannia) naiffi* antigens (a species considered benign) can induce well-modulated responses, and that sera from volunteers cured of cutaneous leishmaniasis recognized immunodominant fractions of this antigen. Previous experiments showed in hamsters that intranasal immunization with total antigens of this species is capable of inducing protective immunity against *L. (V.) braziliensis*. Previously, the same group had already obtained the same protective response using the total antigen of *L. (L.) amazonensis*. However, it is known that not all antigenic components in total antigens are associated with protection, and that the identification of these proteins is an indispensable step in the formulation of a vaccine. The objective of this work was to identify the immunodominant proteins present in the soluble fractions of *L. (L.) amazonensis* (LaAg(s)) and *L. (V.) naiffi* (LnAg(s)), which are conserved within the genus *Leishmania*, to formulate a pan specific vaccine for the control of leishmaniasis. First, LnAg(s) and LaAg(s) antigens were sub fractionated on polyacrylamide gel and bands with molecular weight between 35 and 100KDa were extracted and subjected to mass spectrometry for proteomic analysis. From this analysis, the amino acid sequences, the size of the sequences, and the abundance of proteins were obtained. The most abundant were subjected to analysis of similarity with host proteins. LnAg(s) and LaAg(s) proteins with low similarity (<30%) to human proteins were analyzed by predictors of epitopes recognized by B lymphocytes. In parallel, the prediction of epitopes present in LnAg(s) and LaAg(s), capable of binding with high affinity to the HLA class I and II molecules as well as the promiscuity of each protein for HLA alleles, were evaluated among those that showed abundance and low similarity. Finally, after analyzing the protein homology between *Leishmania* species, 11 proteins were identified with more orthologs.

They were potentially recognized by B lymphocytes, as well as by components of the cellular immune response (predictors of HLA class I and II presentation). Finally, after analyzing the homology of proteins among *Leishmania* species, 11 proteins were identified with more orthologous. They were potentially recognized by B lymphocytes, as well as by components of the cellular immune response predicted by HLA class I and II antigen presentation. This potential for activation of T lymphocytes by the epitopes present in the 11 proteins was increased by the ample capacity of antigenic presentation in the human population, due to the high promiscuity among the HLA alleles regarding the capacity of binding to the epitopes. These results contribute to the identification of antigens potentially capable of composing a vaccine prototype capable of inducing a specific protective immune response in humans, with immunodominant characteristics and inducing humoral and cellular responses, to be used in the control of leishmaniasis.

1. Introdução

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses constituem um complexo de doenças negligenciadas, parasitárias (Silveira et al. 2004 e Garcia et al. 2005) e causadas por cerca de 20 espécies de protozoários dimórficos do gênero *Leishmania*. No homem essas doenças manifestam-se em um espectro amplo de formas clínicas, que podem ser classificadas em: tegumentar (formas cutânea localizada, difusa ou mucosa) e a forma visceral, mais grave e muitas vezes fatal (Burza et al. 2018).

O gênero *Leishmania* pertence ao filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Este gênero é subdividido nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Lainson & Shaw 1987 e Akhoundi et al. 2016).

A forma cutânea localizada é causada, mais frequentemente, pelas espécies *Leishmania (Leishmania) tropica*, *L. (L.) aetropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi*. A forma cutânea difusa é causada pela *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) aetropica*, dentre outras. A forma mucosa é causada, comumente, pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* (Brasil 2007), *L. (V.) panamensis* e *L. (L.) major* (Coutinho et al. 1987; revisto por Da-Cruz & Pirmez 2012, Gradoni 2013 e Ready 2014). Já a leishmaniose visceral é causada pela *L. (L.) donovani*, no Oeste da África e no Sul da Ásia e pela *L. (L.) infantum*, nas Américas Central e do Sul, assim como no Mediterrâneo (*World Health Organization* 2019a).

As espécies dermatóricas de *Leishmania* que mais ocorrem no Brasil são a *L. (V.) braziliensis* que é a mais amplamente distribuída, a *L. (V.) guyanensis* que é mais frequente na região amazônica e a *L. (L.) amazonensis* (Naiff et al, 1988, Lainson et al, 1997 e Oliveira-Neto 2000). No Brasil, a leishmaniose visceral é causada pela espécie *L. (L.) infantum* (Lainson et al. 1987). São observadas diferenças na apresentação clínica das doenças produzidas por esses parasitos e nas respectivas respostas clínicas ao tratamento.

1.2. Ciclo de vida do parasito

A transmissão do parasito se dá pela picada da fêmea do inseto flebotomíneo, em seu repasto sanguíneo. Os gêneros de flebotomíneos envolvidos são: *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Diptera: *Psycodidae*). Esse último, endêmico no Novo Mundo.

Os parasitos do gênero *Leishmania* são digenéticos, apresentando-se sob duas formas evolutivas. No homem e em outros hospedeiros vertebrados, as formas promastigotas metacíclicas do parasito são introduzidas através da picada do flebotomíneo na pele. Essas formas caracterizam-se, morfológicamente, por serem alongadas e com flagelo externo, sendo a forma infectante. Ainda na pele, essas formas são fagocitadas por macrófagos ou por outras células fagocíticas mononucleares. No interior dos fagócitos, as vesículas fagocíticas que envolvem o parasito fundem-se a lisossomos, formando vesículas fagolisossomais. Nesses fagolisossomos, as formas promastigotas transformam-se em formas amastigotas que se multiplicam e infectam outras células. As amastigotas são mais arredondadas e com flagelo interno. O indivíduo infectado torna-se, então, um hospedeiro do parasito (Alexander et al. 1999).

Em um indivíduo infectado, o inseto flebotomíneo ingere células parasitadas do sangue, por formas amastigotas de *Leishmania*. No intestino do inseto, essas formas amastigotas transformam-se em promastigotas. Os parasitos sofrem divisão celular no intestino e posteriormente migram para a probóscide do inseto. O período de desenvolvimento do parasito no organismo do inseto pode durar de 4 a 25 dias (*World Health Organization* 2020a). Num posterior repasto sanguíneo desse inseto, os parasitos presentes na probóscide serão transmitidos a um vertebrado, repetindo o ciclo (*Centers for Disease Control and Prevention* 2017; Burza et al. 2018).

1.3. Manifestações clínicas

Dados epidemiológicos em áreas endêmicas demonstram que a minoria (cerca de 20%) das pessoas infectadas por *Leishmania* desenvolve a doença (Weigle et al. 1993, Singh et al. 2002, Oliveira-Neto et al. 1988 e Marzochi et al. 1980, apud Azeredo-Coutinho, Mendonça 2014), podendo variar, de acordo com a região endêmica e com a metodologia de coleta de dados. O período de incubação do parasito no hospedeiro humano é, em média, de um mês, podendo variar de uma a 21 semanas (Aoun et al. 2020).

No homem, as leishmanioses apresentam-se em diferentes formas clínicas: as formas tegumentares: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutâneo-difusa, leishmaniose mucosa; e a forma visceral, comumente denominada de kalazar. Essas apresentações clínicas variam de acordo com a espécie do parasito e com o estado imunológico do hospedeiro (Alvar et al. 2012).

Dentre as formas tegumentares, a forma clínica mais frequente é a leishmaniose cutânea localizada (LCL). Esta forma caracteriza-se por ocorrência de lesões na pele, com borda elevada e fundo granuloso limpo ou com secreção, em moldura acompanhada ou não de linfadenopatia local, indolor, em geral autolimitada, podendo evoluir para a cura espontânea em 50% dos casos, ou pode evoluir para uma doença crônica e progressiva, deixando cicatrizes permanentes, estigmatizando o paciente também no aspecto psicossocial (Murray et al. 2005; Da-Cruz & Pirmez, 2012).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é incapacitante e é causada, principalmente, pelas espécies *L. amazonensis* e *L. mexicana*. É considerada o pólo anérgico da leishmaniose tegumentar Americana (LTA). O parasita dissemina-se por toda a superfície da pele, sendo abundante nas lesões nodulares, não auto-limitantes. A resposta imune celular não é suficiente para a cura espontânea, tornando necessária a intervenção terapêutica (Convit et al. 1962). O teste intradérmico de Montenegro e o teste *in vitro* da resposta linfoproliferativa a antígenos do parasito, frequentemente são negativos. As lesões teciduais com ulcerações são pouco frequentes (Convit et al. 1993).

A leishmaniose mucosa (LM) é causada principalmente por *L. (V.) braziliensis* e caracteriza-se por surgir tardiamente às lesões cutâneas, e podem acometer e danificar os tecidos das mucosas nasal, oral, faríngea ou laríngea, comprometendo a anatomia e funcionalidade desses órgãos (Oliveira-Neto 1998). Outros parasitos do subgênero *Viannia* também são agentes etiológicos dessa forma da doença. Observa-se uma exacerbação da resposta imune específica aos antígenos de *Leishmania*, considerado o pólo hiperérgico da LTA, responsável por uma inflamação intensa no local das lesões com nenhum ou poucos parasitos. É observada uma falha na modulação da resposta imunológica (Faria et al. 2005).

A leishmaniose visceral (LV) (ou kalazar) é caracterizada por febre, caquexia, hepatosplenomegalia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia e pode levar à morte. Em países mais pobres é comum a co-infecção da LV com a infecção pelo HIV, o que afeta, negativamente, o prognóstico das duas doenças no paciente co-infectado (Diro et al. 2019).

1.4. Epidemiologia

O conhecimento acerca da epidemiologia das leishmanioses, assim como de quaisquer outras doenças infecciosas, é pré-requisito para tomadas de decisão no desenvolvimento de uma nova vacina.

As leishmanioses estão entre as 10 doenças infecto-parasitárias mais relevantes, por ocorrerem numa elevada frequência, pela terapêutica complexa, pela alta taxa de mortalidade e pelos danos físicos irreversíveis e sociais que podem causar (World Health Organization 2019a).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 300.000 novos casos de leishmaniose visceral são estimados por ano, com mais que 20.000 mortes por ano e 1 milhão de casos de leishmaniose tegumentar foram registrados entre 2013 e 2018 no mundo, com 98 países endêmicos para as leishmanioses, nos cinco continentes (World Health Organization 2019a). Cerca de 90% desses países são considerados em desenvolvimento ou menos desenvolvidos (World Health Organization 2004).

A maior parte das áreas endêmicas apresenta co-ocorrência de, pelo menos, duas espécies de *Leishmania*. O Brasil e a Venezuela são os países, no mundo, onde ocorre maior número de espécies em simpatria, sendo detectadas pelo menos 8 espécies (Akhoundi et al. 2016).

A América do Sul apresenta ampla distribuição da LTA, que ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina, não alcançando o Chile e o Uruguai. Quatorze espécies de *Leishmania* são causadoras da LTA nessa região, dentre as quais a maior parte pertence ao subgênero *Viannia* (Cupolillo et al. 2003).

Mais que 90% dos casos de LM ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru. Mundialmente, 94% dos casos novos de LCL reportados em 2017 concentraram-se em 11 países, dentre os quais o Brasil com 17.528 casos (World Health Organization 2019a). Em 2017, quase todos os estados do Brasil registraram a ocorrência de LTA, que se concentrou, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, respectivamente, com 44,7 e 72,7 novos casos por 100.000 habitantes. Esses dados representam o novo aumento dos números, após uma queda desses que foi registrada até 2016. No Brasil, como em outras localidades, a LTA afeta pessoas de ambos os sexos e de todas as idades, com maior incidência entre homens, de 20 a 34 anos, sendo prevalente também, nas faixas etárias a partir de 35 anos (Brasil 2017).

No Brasil, a LTA ocorre em zonas rurais e periurbanas, com a manutenção dos focos silvestres e tendência na expansão geográfica da doença. Segundo o Ministério da Saúde, a LTA apresentou média anual de 26.965 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 15,7 casos/100.000 habitantes, no período entre 1993 e 2012 (Brasil 2019)

A América do Sul e o Oeste da África (Sudão, Quênia e Etiópia) apresentam a maior parte dos casos de leishmaniose visceral, onde ocorrem as maiores taxas de mortalidade pela doença. São estimados, no mundo, a cada ano, a ocorrência de 500.000 novos casos de LV. O Brasil registra o maior número de casos, na América do Sul (WHO 2019). Em 2017, as regiões Norte e Nordeste apresentaram os maiores coeficientes de incidência de casos de LV, com 3,4 e 3,8 novos casos por 100.000 habitantes, respectivamente (Brasil, 2019).

No Brasil, a LV afeta, principalmente, homens (65,07% dos casos), em sua maioria, com idade entre 0 a 19 anos (95,92% dos casos). A razão apontada para essa predominância é a maior exposição dessas pessoas ao vetor em áreas endêmicas e a menor procura das Unidades de Saúde, pelos homens afetados com a doença. Além disso, fatores hormonais são relatados como protetores para as mulheres em idade reprodutiva (Da Cunha et al. 2020). A incidência maior na faixa de 0 a 10 anos está relacionada, também, à imaturidade do sistema imunológico característico dessa idade e à má nutrição (Brasil 2017).

1.5. Resposta imune nas leishmanioses e o desenvolvimento de vacinas

A resposta imune capaz de proteger o indivíduo de desenvolver a LCL ou LV, assim como de controlar a replicação do parasito, é uma característica intrínseca do hospedeiro infectado. O conhecimento das bases desse tipo de resposta pode contribuir para o desenvolvimento de uma formulação vacinal que mimetize essa proteção. No entanto, esses mecanismos ainda não são bem compreendidos (Costa e Nery Costa, 2014).

Por se tratar de um parasito intracelular, a resposta imune nas leishmanioses é mediada predominantemente por mecanismos celulares, mas também possui a participação de elementos da resposta humoral. A regulação das respostas de linfócitos TCD4+ e TCD8+ é diferente entre as espécies de *Leishmania* (Liew et al 1987, Soong et al. 2012, Rodrigues et al 2016)

O equilíbrio entre células T reguladoras e linfócitos efetores, e o equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2, têm sido alvos de estudos na elucidação das respostas imunes relacionadas ao controle do parasito ou à progressão da doença. Em camundongos infectados com *L. major*, a resposta por células TCD4+ tipo Th1, secretoras de IFN- γ e IL-12, com a consequente ativação de macrófagos e síntese de NO e eliminação intracelular dos parasitos, é uma resposta relacionada à resistência à infecção ou ao seu controle, mas também ao dano tecidual e à geração de células protetoras de memória (Liew et al. 1987).

Por outro lado, foi observado que a ativação de linfócitos TCD4+, secretores de IL-4 e IL-10, regulando negativamente a ativação de macrófagos, como característica de uma resposta Th2, relaciona-se a uma resposta de susceptibilidade à infecção e à progressão da doença (Heinzel et al. 1995 e Kaye et al. 2011).

Na LTA, portanto, o perfil de resposta Th1 está associado à proteção e resistência a mecanismos de infecção por *Leishmania*, pela produção de citocinas pró-inflamatórias, redução da carga parasitária e aumento da lesão tecidual. A resposta Th2 é associada à susceptibilidade à infecção e manutenção da carga parasitária (Rodrigues et al. 2015). Na LC, em geral, altos níveis de IL-10, com baixos de IL-12, também levam à ativação de um perfil de células Treg, com retroalimentação de IL-10 e produção de TGF- β (Mendez et al. 2004 e Morgado et al. 2008). Estudos com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes de áreas endêmicas mostraram que o estímulo dessas células com antígenos de *L. braziliensis* leva a uma maior indução de células T que o estímulo antigênico de outras espécies, como *L. amazonensis* ou *L. guyanensis* (Camacho 2005).

Estudos anteriores demonstraram que *L. naiffi* produz uma ativação de macrófagos diferente da induzida por *L. braziliensis* e por *L. guyanensis*. Foi demonstrado que a *L. naiffi* apresenta uma alta capacidade de infectar macrófagos, proliferando-se no interior dos mesmos, com uma baixa capacidade de ativá-los. Essa característica faz com que o parasito demore mais tempo, para ser destruído e pode estar associada a uma destruição também mais lenta dos tecidos subjacentes ao sítio da infecção. Observou-se, também, uma alta capacidade de ativar a proliferação de linfócitos, com níveis bem regulados de IFN- γ (Camacho 2005). Por se tratar de uma doença que possui formas clínicas graves associadas com exacerbação de resposta imune, a utilização de espécies naturalmente indutora de resposta imune bem modulada para identificação de antígenos vacinais, é uma estratégia importante para evitar efeitos deletérios induzidos pelo imunógeno.

Apesar da precedência das células TCD4+ na produção de citocinas e do predomínio das mesmas na resposta contra a infecção por *Leishmania*, a ativação de linfócitos TCD8+ também é importante tanto para o controle da doença e para a produção de uma resistência primária à infecção, quanto para a indução de uma imunidade protetora duradoura (Müller 1992; Wang et al. 1993 e Huber et al. 1998).

Em cães vacinados com a vacina Leishmune® (antígenos de *L. donovani*), que desenvolvem uma resposta imune eficaz, é observada a ativação de células TCD8+ e aumento das células circulantes desse fenótipo (Araújo et al. 2008).

Em pacientes curados, também é observado um aumento preferencial de células TCD8+, levando a um equilíbrio na relação CD4+/CD8+ (Maasho et al. 1998 e Da-Cruz et al. 2000). Da-Cruz e colaboradores (1994) apontaram a associação de células TCD8+, dentre outros fatores, com a cura na infecção por *L. braziliensis*.

Na infecção experimental de camundongos C57/ BL/6 por *L. (L.) major* é observado que a ativação de células TCD8+ contribui para o controle da LC. Camundongos com depleção dessas células são menos resistentes à infecção por uma baixa dose de *L. major* (Belkaid et al. 2002 e Uzonna et al. 2004). Ainda nesse modelo de infecção, a ativação das células TCD8+, com produção de INF- γ , direciona a resposta imunológica para o perfil Th1 e resulta em proteção de longo prazo (Pompeu et al. 2001 e Colmenares M et al. 2003; Okwor et al. 2014). Assim como células natural killer (NK) e células T $\gamma\delta$, as células TCD8+ também são importantes fontes de IFN- γ , nas leishmanioses (Muller et al. 2002). Células T CD8+ antígeno específicas também são importantes na resposta imune protetora, pela morte de células do hospedeiro infectadas e incapazes de eliminar patógenos intracelulares (Egui 2018).

Pacientes infectados por *L. braziliensis* e acometidos por LM apresentam resposta imune celular com padrão inflamatório, com ativação de células TCD8+, que pode ser danosa para o hospedeiro humano infectado por *L. braziliensis*. Essa ativação pode causar injúria tecidual, progressão da doença e evolução para a LM. Porém, estudos demonstram que uma fina regulação da ativação dessas células leva ao controle da infecção por *L. braziliensis* e à proteção contra a infecção por *L. panamensis* (Tuon et al. 2008 e Jayakumar et al. 2011). Em cães vacinados com a vacina Leish-immune® (antígenos de *L. donovani*) que desenvolvem uma resposta imune eficaz é observada a ativação de células TCD8+ e aumento das células circulantes desse fenótipo (Araújo et al. 2008).

A infecção primária por *Leishmania* produz células TCD8+ de memória que irão atuar, em infecções posteriores, concomitantemente às células TCD4+ de memória, no controle da infecção (Muller 1992). Sobretudo na infecção primária, as células T CD8+ cooperam e são imprescindíveis para a produção de memória imunológica por células TCD4+, tendo uma função potencialmente reguladora (Mendez et al. 2001 e Okwor et al. 2014). Camundongos que têm deficiência em fas ou no ligante de fas, mesmo com alta produção de NO, não são capazes de eliminar *L. major* (Huang et al. 1998). A importância das células TCD8+ não se restringe aos estágios iniciais da doença. Após a cura da LC, a produção de INF- γ por essas células auxilia na cicatrização da lesão (Mohajery et al. 2007). A atividade granzima dessas células é um dos principais mecanismos ativos nessa resposta inflamatória (Faria et al. 2009; Novais et al. 2013 e Santos et al. 2013). Na resolução da leishmaniose visceral, as células TCD8+ são importantes no sequestro de parasitas fagocitados, para a formação de granulomas. Também é importante para a produção de citocinas pró-inflamatórias e para a citólise de células infectadas (Tsagozis et al. 2003). A consideração das funções das células TCD8+ na infecção por *Leishmania* tem sido um novo paradigma quando se pensa na produção de resposta imune induzida por uma vacina.

A relação entre as respostas celular e humoral na proteção frente a diversos antígenos de *Leishmania* também constitui outro critério necessário para o desenvolvimento de uma vacina contra as leishmanioses. Na leishmaniose humana, tem-se observado que a resposta humoral se dá, predominantemente, na fase ativa da doença, tendendo a diminuir ou a desaparecer, em meses, após a cura espontânea ou à cura pelo tratamento (Fagundes-Silva et al. 2012). É observada uma variação nos títulos de anticorpos, nas diferentes formas clínicas e em diferentes cargas parasitárias. Esses títulos são mais altos na LCD (Vexenat et al. 1996, Camacho 2005, Gomes-Silva et al. 2008 e Rostamian et al. 2019).

Sabe-se que a prevalência de determinados isotipos de Igs pode relacionar-se à presença de respostas Th1 ou Th2 e, conseqüentemente, ao estágio de infecção e ao prognóstico da doença causada por esta, tanto na LTA quanto na LV (Galvão-Castro et al. 1984 e Coffman et al. 1988).

A detecção de anticorpos IgG2 nas leishmanioses está relacionada ao perfil de resposta Th1, portanto, à resistência à infecção (Coffman et al. 1988).

Na LV, a polarização Th1/Th2 ocorre quase que da mesma forma que na LC, embora a mesma não seja claramente detectada em modelo animal. A proteção e a

resistência à infecção na LV, assim como na LC, também são associadas à resposta Th1, em presença da citocina IL-12. Porém, essa resposta, apenas, não é suficiente para o controle da infecção/ doença, sendo necessários outros fatores atuando conjuntamente (Singh et al. 2012). Alguns estudos demonstram a importância de citocinas pró-inflamatórias para a depleção de *L. donovani* (Bhattacharjee et al. 2012). Em modelo murino (C57/ BL6) essa proteção está associada à ativação de IL-10, que reprime a atividade anti-parasitária de macrófagos residentes resultando na manutenção residual de parasitos no fígado e induzindo a ativação de células TCD4+/INF- γ +. A proteção associada aos níveis de IL-10 e à carga parasitária residual também foi observada no modelo murino (Murray et al. 2002).

1.6. Controle

As formas de controle preconizadas contra as leishmanioses, no momento, baseiam-se no uso de repelentes tópicos tanto em cães, como em humanos, uso de inseticidas, medidas de higiene e de saneamento, e a mobilização social em parceria com os sistemas de saúde locais para contenção da proliferação do vetor (World Health Organization 2019b).

O tratamento para qualquer forma de leishmaniose ainda se baseia nas séries de injeções intramusculares, dolorosas, com antimoniais pentavalentes, desenvolvidos há mais de 50 anos (Brasil 2019). Esses antimoniais são extremamente tóxicos para o fígado, rins e coração, além de serem ineficazes em muitos casos. A resistência do parasita aos fármacos e o abandono do tratamento por grande parte dos pacientes são as principais limitações dessa estratégia de controle (Schriefer et al. 2008). Outras escolhas são a anfotericina B, a pentamidina, a paramomicina e a miltefosina (Croft & Olliaro 2011).

O controle de animais considerados reservatórios tem se dado, essencialmente, com a imunoprevenção e a imunoterapia aplicada a cães, além da eutanásia desses animais infectados, quando não curados (Dantas Torres 2019). Essas medidas têm resultado em significativo controle das leishmanioses, mas não são totalmente eficazes, devido à proteção da vacina não ser total e de não haver comprovação de eficácia contra a LC canina (Moafi et al. 2019). Também ocorrem dificuldades intrínsecas ao diagnóstico e à eutanásia dos cães infectados.

A continuidade dessas medidas de controle ainda será necessária e complementar, mesmo com a existência, futuramente, de uma vacina para humanos, devido à multiplicidade de fatores envolvidos na transmissão do parasito (como diversidade de

vetores e de reservatórios), além da susceptibilidade do hospedeiro humano. Por essa razão as leishmanioses não são doenças elegíveis para ações de erradicação, mas para controle e eliminação. Tal objetivo será mais efetivo e duradouro somente com ações de imunização em massa, nas áreas endêmicas (Dowdle 1999).

Diante deste quadro, é grande a busca por novos fármacos para o tratamento da doença e também por uma vacina que possa aumentar a resistência do hospedeiro ao protozoário e prevenir a doença. Não existe ainda nenhuma vacina aprovada para uso humano, apesar dos esforços de centenas de grupos de pesquisa ao redor do mundo, na busca de uma formulação vacinal eficiente contra as leishmanioses.

1.7. Vacinas para leishmanioses

A vacinologia convencional proporcionou algumas contribuições na história do desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses. A primeira intervenção, nesse sentido, foi a leishmanização, que consiste na inoculação de exsudatos de promastigotas vivas em indivíduos sem contato com o parasito. Essa imunização conferia um grau de proteção elevado, produzindo uma resposta imune polarizada para Th1. Porém, foi descontinuada, por apresentar problemas de segurança e de padronização, mantendo-se, apenas em alguns países do Oriente Médio e da antiga União Soviética (Nadim et al. 1983; Amini 1991; Dunning 2009 e Khamesipour et al. 2005).

De forma geral, as vacinas podem ser classificadas em vacinas de primeira geração (parasitos mortos ou atenuados), de segunda geração (frações brutas, subunidades definidas e proteínas recombinantes) ou de terceira geração (vacinas de DNA e vetorizadas). Neste capítulo será dado destaque para as vacinas de primeira e de segunda.

1.7.1. Vacinas de primeira geração

Os primeiros testes com parasitos de *Leishmania* mortos como vacina foram realizados no Brasil na década de 1940. Entre os primeiros estudos, Pessoa e Pestana desenvolveram uma vacina constituída por 18 cepas dermatrópicas de *Leishmania*, marcando a literatura científica como o primeiro ensaio clínico controlado, realizado em humanos utilizando uma vacina anti-LTA (Pessoa & Pestana, 1940 *apud* Santos 1999).

No Brasil, outra vacina aprovada para ensaio clínico em humanos, posteriormente, foi a Leishvacin[®], vacina composta por lisado total de promastigotas uma cepa de *L. amazonenses*. Inicialmente estudada pelo grupo do Dr. Wilson Mayrink (Mayrink et al. 1979), passou a ser produzida pela empresa BioBrás em Montes Claros (MG) a partir de 1991. Foram efetuados ensaios clínicos de fase 1, atestando a segurança (Marzochi et al. 1998) e de fase 2, atestando a imunogenicidade (De Luca et al. 1999), porém em ensaio de eficácia realizado na Colômbia não induziu proteção em indivíduos contra a infecção cruzada por espécies do subgênero *Viannia* (Velez et al. 2005), tendo a produção industrial descontinuada.

Ao longo das décadas seguintes, numerosas preparações de parasitos mortos foram testadas, sozinhas ou em combinação com uma variedade de adjuvantes. Embora exibindo perfis de segurança bem tolerados, até o momento, nenhuma vacina de primeira geração usando parasitos mortos demonstrou eficácia suficiente como vacina profilática para ser usada em programas de controle generalizados (Noazin et al. 2008).

Após essa tentativa, foram produzidos parasitos vivos atenuados, contra as leishmanioses. Essas vacinas, assim como a leishmanização, expõem toda a capacidade antigênica do patógeno, ativando adequadamente as respostas imunes do receptor (Silvestre et al. 2008). A atenuação pode ser feita através de passagens sucessivas de cultura do parasito, exposição do mesmo à irradiação gama ou a agentes químicos e tem por objetivo neutralizar a patogenicidade do agente etiológico. Nesses casos, as mutações genéticas decorrentes são inespecíficas e aleatórias, não podendo ser padronizadas.

A engenharia genética permitiu a produção de cepas de parasitos com atenuações molecularmente definidas, e mais eficientes (Selvapandiyar et al. 2009; Dey et al. 2013 e Zhang et al. 2020). Porém, apesar de serem promissoras, essas vacinas apresentam o risco de reversão para o genótipo selvagem, pela expressão de genes compensatórios de *Leishmania*. (Spath et al. 2004). Esse é o maior desafio de segurança, para que essas vacinas passem por testes clínicos em humanos.

Tratando-se de vacinas vivas atenuadas, a disponibilidade das sequências genômicas de cepas virulentas e não virulentas de *Leishmania* tornou possível a inativação assertiva de espécies patogênicas, como *L. major*, através da análise comparativa dos genomas dessas com os de espécies não patogênicas, como *L. tarentolae*. A inativação randômica de genes virulentos, através de agentes químicos ou físicos deu lugar à inativação específica de genes identificados como virulentos, espécie-

específicos ou conservados e cruciais para os mecanismos de escape do parasito (Peacock et al. 2007 e Raymond et al. 2012).

A identificação dos genes relacionados à virulência, juntamente com a manipulação genética dos mesmos, associados às técnicas de transfecção, constituem um grande avanço para a atenuação, com menor risco de reversão, de espécies de *Leishmania* levando-se em conta que os parasitos são organismos complexos.

1.7.2. Vacinas de segunda geração

As vacinas de subunidades têm surgido como uma alternativa às vacinas completas, pois apresentam baixos riscos de segurança. As subunidades podem ser identificadas por ferramentas convencionais, tais como sorológicas, bioquímicas, microbiológicas e genéticas. Mais que 30 subunidades proteicas de *Leishmania* já foram isoladas, caracterizadas e testadas como candidatas vacinais após décadas de pesquisa. Os critérios observados para essa seleção, em geral, foram: abundância do antígeno na *Leishmania* (Etges et al. 1985), frequência de reconhecimento por soro de pacientes ou de animais infectados - proteína *thiol specific antioxidant* - TSA (Webb et al. 1998). Esses antígenos foram isolados por análise de sequência tag de bibliotecas de DNA complementar - cDNA (LeIF); pelo rastreamento de fragmentos do parasita, recuperados de soros de pacientes infectados (*cysteinases proteins* ou CPs - Rafati et al. 2001); e por clonagem diferencial (Antígeno Amastigota Específico A2 ou Antígeno A2 - Charest & Matlashewski, 1994).

Quatro vacinas de segunda geração contra as leishmanioses caninas já foram comercializadas, até o momento. A CaniLeish® e a LetiFend®, na Europa e a Leishmune® e a Leishtec®, no Brasil.

A Leishmune® (Fort Dodge Wyeth, posteriormente Zoetis, Brasil) é uma vacina de segunda geração, composta pelo complexo de proteínas ligantes de fucose-manose de *L. donovani*, tendo saponina como adjuvante. Desse complexo, a GP36 é o principal antígeno. Foi a primeira vacina licenciada no Brasil, contra a leishmaniose visceral canina (Borja-Cabrero et al. 2002), tendo seu uso suspenso por falhas nos resultados de eficácia nos testes clínicos de fase III (Brasil 2014).

A Leishtec® (Hertape Calier Saúde Animal, posteriormente Ceva, Brasil) também é uma vacina de segunda geração, composta pela proteína recombinante A2, também tendo a saponina como adjuvante. Atualmente é a vacina autorizada para uso, contra a leishmaniose canina, no Brasil (Fernandes et al. 2008 e Ceva 2019). Ultimamente, vem

sendo empregada, também, para tratar a doença em cães, como imunoterapia, com resultados promissores (Toepp et al. 2018). Outra alternativa, mais segura em relação às vacinas atenuadas são as vacinas recombinantes e de subunidades. Esse desenho vacinal tem demonstrado ser o mais promissor, dentre as alternativas da vacinologia convencional. Essas têm sido testadas e aprovadas para uso em cães, contra a leishmaniose visceral (Rafati et al. 2005 e Rafati et al. 2006). Outra vacina com essa abordagem é a LEISH-F, composta de poliproteínas TSA, LmST11 e LeiF-MPL-SE, que são proteínas conservadas em *Leishmania* e é a única atualmente em fase de ensaio clínico em humanos, por ter sido comprovada proteção em camundongos, hamsters e macacos rhesus (Skeiky et al. 2002 e Chakravarty et al. 2011).

Em pacientes com LCL e com LM, infectados por *L. braziliensis*, a vacina mostrou-se segura e imunogênica, na formulação LEISH-F1 + MPL-SE, administrada como imunoterapia (Llanos Cuentas et al. 2010 e Nascimento et al. 2010). Uma variação dessa formulação, na qual o adjuvante MPL-SE é substituído pelo mais potente GLA-SE, também tem apresentado respostas protetoras contra infecção por *L. infantum* e *L. donovani*, no modelo murino (Coler et al. 2015).

Pela estratégia de poliproteína, foi desenvolvida também uma vacina contendo as subunidades CPA-CPB-A2 e A2-Kmp11-CPB-SMT (KSAC). Essa formulação tem apresentado resultados promissores em modelos experimentais e em cães (Saljoughian et al. 2013 e Goto et al. 2011).

Os alvos vacinais proteicos ou de peptídeos têm se mostrado uma tendência promissora para a composição de uma vacina molecularmente definida para o controle da leishmaniose, assim como de outras parasitoses. As vantagens dessa estratégia em relação às vacinas clássicas (como as de antígenos totais e as de subunidades) são: a menor produção de efeitos indesejados, por apresentarem maior segurança, o menor custo na produção em larga escala, boa estabilidade, ausência de materiais potencialmente danosos, além de serem antígenos de baixa complexidade e de oferecerem um grande repertório de possibilidades de combinações.

Desde o sequenciamento genômico completo de *Leishmania major*, em 2005 (Ivens et al. 2005), novas possibilidades para a busca de alvos vacinais, através da vacinologia reversa têm surgido.

1.8. Vacinologia reversa

A vacinologia reversa permite desenhar a vacina de uma forma mais racional, predizendo as características potencialmente imunogênicas dos componentes do patógeno alvo (Rinaudo et al. 2009; Seib et al. 2009 e De Groot e Rappuoli 2007). Os métodos de predição de características e interações imunológicas das proteínas têm contribuído para desenhos de vacinas mais elaborados, além de testes diagnósticos e imunoterapia (Tsimberidou 2015, Cotugno et al. 2019 e Dias & Torkamani 2019).

Apesar de depender da validação de seus dados, através da pesquisa experimental, a bioinformática apresenta diversas vantagens:

1) Seleção do menor número possível dos melhores potenciais alvos vacinais, a partir do genoma completo dos patógenos, tornando os resultados da busca mais acurados. Essa vantagem é conferida pela variedade cada vez maior das ferramentas *in silico*, com mais acurácia. Além disso, genomas e proteomas de diversos patógenos estão disponíveis (De Groot et al. 2002).

2) Melhor caracterização de alvos vacinais, além do conhecimento de seus mecanismos de ação e a eliminação dos efeitos indesejados. A predição de interações de proteínas imunogênicas em sistemas biológicos, como células infectadas, torna essa caracterização possível (Ali et al. 2013).

3) A ampliação do foco da pesquisa por alvos vacinais contra doenças parasitárias, incluindo, por exemplo, potenciais epítomos intracelulares, além das proteínas secretadas ou de membrana celular, que são mais investigadas, tornou-se mais viável pela possibilidade, dada pela bioinformática, da verificação de todo o proteoma do parasito.

5) A bioinformática também permite rastrear, através de análises de homologia, proteínas ou peptídeos conservados entre as diferentes espécies de *Leishmania*. Se proteínas conservadas, potencialmente antigênicas e imunogênicas apresentam ortólogos em diversas espécies do parasito, tem-se potenciais alvos vacinais pan específicos, ou seja, com potencial de proteger contra as espécies do parasita a que são homólogas. Resultados em que se observou que células T CD4⁺/Ly6C⁺/IFN- γ ⁺, induzidas pela infecção por *L. major* são capazes de promover uma proteção cruzada à LV, causada pela infecção por *L. donovani* (Romano et al. 2015), podem basear a hipótese de que antígenos de espécies causadoras de LC podem proteger também contra a LV.

A seleção de antígenos que possam conferir uma resposta eficaz contra a leishmaniose é um dos principais desafios para o desenho de uma vacina de segunda

geração. A predição computacional tem sido a principal ferramenta para o mapeamento de proteínas ou de peptídeos imunodominantes, permitindo identificar ligações de alta afinidade entre peptídeos de *Leishmania* e moléculas do hospedeiro, como antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I (no caso de epítomos apresentados a linfócitos TCD8+), HLA de classe II (para epítomos apresentados a linfócitos TCD4+), e receptores de antígenos de linfócitos B (de Brito et al. 2018). A importância dessa predição é a possibilidade de reduzir as falhas na apresentação/reconhecimento de antígenos, que tem sido um dos motivos apontados para falha nas vacinas em testes clínicos (Seyed et al. 2016).

Epítomos são os menores peptídeos imuno-estimulatórios, derivados de antígenos endógenos ou exógenos (Trowsdale & Knight, 2013), apresentados por moléculas HLA presentes em células apresentadoras de antígenos (APCs). Através das moléculas de HLA, esses antígenos são reconhecidos por receptores de células T (TCRs). O HLA é um agrupamento de genes (poligênicos, polimórficos e codominantes) que codifica glicoproteínas de membrana, cuja função é apresentar o antígeno peptídico às células T em humanos (Klein et al, 1993 e Janeway et al. 2002).

Podem ser HLA de classe I (que apresentam antígenos derivados de proteínas processadas no citosol) ou de classe II (apresentam peptídeos derivados de proteínas processadas em vesículas de macrófagos, células dendríticas ou linfócitos B. Os antígenos apresentados por HLA de classe II são reconhecidos por células TCD4+ (Janeway et al. 2002).

A região genômica do HLA é a mais polimórfica do genoma humano, podendo variar por etnia e por região geográfica. Tal polimorfismo manifesta-se através de mutações pontuais, inserções e deleções, dando origem a posições variantes de um gene (alelos), em relação a uma sequência referência, o que se torna outro grande desafio para a identificação de alvos vacinais (Khan 2017).

Uma condição importante para que epítomos sejam aceitos como melhores alvos vacinais é que os mesmos sejam promíscuos e favoreçam o encaixe com vários alelos de HLA, sendo efetivos na maior parte das populações de áreas endêmicas do mundo (Wang et al. 2016).

O mapeamento, *in silico*, de todos os possíveis epítomos promíscuos no genoma ou proteoma de um determinado patógeno, apresentados por supertipos de HLA tem sido a forma de solucionar essa questão. Supertipos de HLA são grupos alélicos compostos por pequenas partes de suas sequências (ou motivos) de ligação a peptídeos, semelhantes

entre si, com base na composição de resíduos, nos seus sítios de ligação a peptídeos ou na sobreposição de suas especificidades de ligação aos mesmos. Esses podem apresentar, também, “supermotivos”, que ligam um grupo de peptídeos com afinidades equivalentes. Assim, epítomos que se ligam fortemente a uma molécula de HLA, podem ligar-se a outras moléculas dentro do mesmo supertipo (Wang et al. 2016). Os supertipos HLA-A2, HLA-A3 e HLA-B7 ocorrem em mais que 90% da população humana mundial (Reche e Reinherz 2007).

Até agosto de 2019, o “*International Immunogenetics Project (IMGT)/HLA Sequence Database*”, repositório oficial para sequências de HLA, do Comitê de Nomenclatura da OMS para Fatores do Sistema HLA, registrou mais de 362.709 alelos de 24.093 genes ou fatores de HLA (Robinson et al. 2020).

Epítomos de células B são regiões antigênicas de proteínas que podem ser reconhecidas por sítios de ligação de moléculas de imunoglobulinas (Van Regenmortel et al. 1993). Esses epítomos podem ser classificados nas categorias de: i) conformacionais ou descontínuos, formados na estrutura terciária da proteína, quando os resíduos de aminoácidos estão afastados na sequência, mas aproximam-se, pelo dobramento da proteína; ou ii) lineares ou contínuos, quando é formado por uma sequência contínua de resíduos de aminoácidos (Barlow et al. 1986).

Porém, essa divisão não é tão exata, pois um epítomo conformacional pode ser formado por uma ou mais sequências contínuas de resíduos de aminoácidos e a estrutura tridimensional é a característica final que faz com que o anticorpo se ligue a determinado antígeno (Van Regenmortel 2006).

A predição computacional de epítomos de células B é amplamente empregada no desenho de vacinas e de testes diagnósticos. Cerca de 90% dos epítomos de células B de uma proteína são conformacionais (Pellequer et al. 1991). No entanto, os epítomos lineares são os mais explorados, para a produção de vacinas e para diagnósticos, pela maior facilidade de síntese dos mesmos, em relação aos epítomos conformacionais. Outra aplicação do reconhecimento de epítomos por células B é a pesquisa em alergias, determinando a reatividade de IgE contra alérgenos (Sélo et al. 1999).

A imunoinformática fornece ferramentas eficientes nesse mapeamento, em substituição aos métodos laboratoriais, que demandam mais tempo e recursos para a obtenção de resultados, frente à volumosa quantidade de epítomos de uma proteína (Reineke & Schutkoski 2009 e Flower 2007).

A ligação ao HLA é um fator essencial para a ativação de células T. Os algoritmos matemáticos considerados para prever epítomos capazes de se ligarem a HLA, com alta afinidade, e de serem apresentados e ativar TCRs, são baseados na sequência de aminoácidos e na estrutura antigênica das proteínas (Liao & Arthur 2011 e Resende et al. 2012).

Os métodos de matrizes quantitativas e de aprendizagem de máquina têm sido os mais utilizados, em função de diversas limitações em relação a uso de bancos de dados, pelos outros métodos. No entanto, para a obtenção de melhores resultados, tem sido extensivamente aconselhável o uso de vários algoritmos.

Com o objetivo de melhorar a acurácia e a sensibilidade da análise, diversos programas de imunoinformática, de acesso aberto, combinam esses, ou algum desses métodos, para a predição de epítomos de células T ou B (Yu et al. 2002).

A acurácia é um parâmetro de medida, comum na imunoinformática, que significa a probabilidade de determinação correta dos epítomos, com base nos critérios do método utilizado. É dada por: $Q_{acc} = (TOTc/Total) * 100$, onde TOTc é o número total de predições corretas, (incluindo verdadeiros positivos e verdadeiros negativos) e o total é o número de predições realizadas (Saha & Raghava 2006).

A partir dessas ferramentas e novas abordagens tem sido possível desenvolver desenhos de vacinas baseadas em proteínas, poliepítomos ou polítopos, com menores riscos de segurança, em relação aos desenhos convencionais. A eficiência desse método tem sido comprovada pela validação experimental de diversos compostos vacinais elaborados a partir dessas análises (De Brito et al. 2019).

Uma das contribuições da imunoinformática para o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses é a identificação de diversos potenciais epítomos com alta capacidade de estimular células TCD4+ e TCD8+, o que é chamado de “mapeamento de epítomos” (Paape e Aebischer 2011; Aebischer 2014 e Singh et al. 2015).

A partir dessa identificação, vacinas poli epítomos ou polítopos têm sido desenvolvidas contra as leishmanioses. A pesquisa de vacinas de polítopos contra as leishmanioses também tem lançado mão de camundongos humanizados, como um dos principais modelos animais, para os testes de eficácia e de proteção. O desenvolvimento de novos modelos experimentais também é um desdobramento da imunoinformática (Seyed et al. 2014). Ainda não se encontrou a formulação vacinal poliepítomos ideal, mas diversos grupos têm trabalhado nesse sentido, seja utilizando vacinas já validadas, como vetores vacinais para a inclusão de peptídeos, seja pelo enriquecimento de vacinas de

DNA com genes de epítomos imunoestimuladores de células TCD4+ e TCD8+ (Kedzierska et al. 2012 e Das et al. 2014).

A vacina de DNA, de marca LEISHDNAVAX®, enriquecida por epítomos indutores de células T, preditos por imunoinformática, apresentou ótimos resultados em modelo murino *in vivo* e humano *ex vivo* (estímulo de células T), em relação à imunogenicidade e eficácia contra a LV. Essa vacina encontra-se em fase I de teste clínico, apresentando-se imunogênica em populações geneticamente diversas (Kamhawi et al. 2014b; *European vaccine Initiative 2017* e *Global Health Technologies Fund 2016*).

A imunoinformática contribui para a otimização do tempo de desenvolvimento de uma vacina anti-parasitária, considerando-se o tamanho do proteoma de parasitos, em relação a outros organismos patogênicos, como vírus e bactérias.

Além disso, essas vacinas eliminam o risco de reversão à patogenicidade das vacinas vivas atenuadas. Nelas, epítomos de uma proteína ou uma combinação de diferentes proteínas de um patógeno, ou conservadas entre diferentes patógenos podem ser reunidas em uma única formulação vacinal.

2. Racional e Justificativa

Uma das únicas vacinas aprovadas para ensaios clínicos, composta por antígenos totais do subgênero *Leishmania* (*L. amazonensis* - Leishvacin®), quando administrada por via intramuscular não protegeu indivíduos contra infecção com espécies do subgênero *Viannia* (Vélez et al. 2005). Uma possível hipótese para explicar a ausência de proteção nesse ensaio clínico poderia ser que a presença de antígenos do subgênero *Viannia*, associada ou não à via de administração utilizada (injetável), poderia influenciar na eficácia protetora vacinal.

Trabalhos anteriores do grupo no modelo murino demonstraram que o antígeno bruto de *L.(L.) amazonensis* (lisado total de promastigotas de *L. amazonensis* – LaAg) quando administrado por via injetável - subcutânea ou intramuscular (IM) - promove agravamento da infecção por *L. amazonensis* (Pinto et al. 2003 e Pinheiro et al. 2005). No entanto, quando o mesmo antígeno foi administrado por via mucosa (oral ou nasal), observou-se eficácia do uso de vias não injetáveis na proteção contra a infecção por *L. amazonensis* (Pinto et al. 2003 e Pinto et al. 2004).

Além disso, trabalhos do grupo do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz (LIPMED- IOC) demonstraram que a espécie *L. (V.) naiffi* produz uma ativação de macrófagos diferenciada, em relação a *L. (V.) braziliensis*, levando a uma destruição mais lenta do parasito internalizado *in vitro*. Essa característica pode ser associada ao dano tecidual mais brando dos tecidos adjacentes às lesões. O antígeno solúvel desse parasita, denominado de LnAg(s), induz de forma muito eficiente resposta linfocitária e uma produção de IFN- γ bem modulada, como observado em células humanas *in vitro* (Camacho 2005).

A partir desses resultados, consideramos que antígenos de *L. (V.) naiffi* poderiam compor uma formulação vacinal no controle das leishmanioses. O racional para a busca de potenciais antígenos vacinais nesta espécie de *Leishmania* foi: 1) esta espécie causa doença benigna, não havendo relatos de formas clínicas associadas à hiperativação da resposta imune (forma mucosa) ou tolerização (forma cutânea difusa); 2) seus antígenos são imunogênicos, induzindo tanto resposta humoral quanto celular; 3) seus antígenos são reconhecidos por resposta imune específica induzida por outras espécies de *Leishmania*; 4) seus antígenos apresentam capacidade de induzir respostas imunes bem moduladas.

Outros estudos também demonstraram que antígenos totais dessa espécie (LnAg) assim como de *L. amazonensis* (LaAg), quando administrados em hamsters por via intranasal, apresentam uma maior eficácia vacinal contra a infecção por *Leishmania braziliensis*, do que quando administrados por via intramuscular. O antígeno LnAg induziu maior proteção que o antígeno LbAg, também proveniente do subgênero *Viannia*. Os grupos que foram imunizados com os antígenos LaAg, LbAg e LnAg pela via intramuscular não foram protegidos (Figura 1).

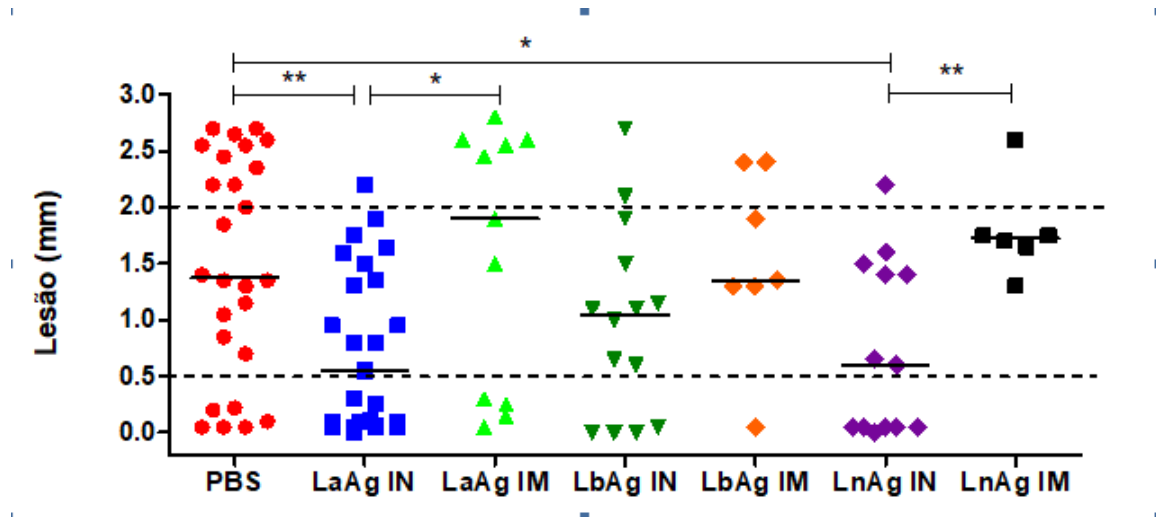


Figura 1: Comparação da eficácia protetora de antígenos totais de diferentes espécies de *Leishmania* por via intranasal e intramuscular contra a infecção por *L. (V.) braziliensis* no modelo hamster. Morfometria de pata de hamsters imunizados por via intranasal (IN) ou intramuscular (IM) com 20 ug de LaAg, LbAg ou LnAg. O grupo controle recebeu PBS. Todos os animais foram infectados com 1×10^5 promastigotas de *L. braziliensis*. Os gráficos representam a lesão individual dos animais no dia 80 após a infecção. * $p < 0,05$.

Outro racional importante foi que a cicatrização das lesões cutâneas não é garantia da eliminação do protozoário. Estudos com cicatrizes de LCL longo tempo após a cura demonstraram a presença de antígenos de *Leishmania* e uma resposta imune em atividade. Consideramos que essa resposta imune que se estabelece após a cura estável da LCL deve constituir um padrão a ser preferencialmente induzido por uma preparação vacinal, pois esta resposta mantém o parasito sob controle por vários anos.

Dessa forma, nossa estratégia de busca de candidatos vacinais promissores foi iniciada a partir da identificação de frações imunodominantes, pela utilização da metodologia de *Immunoblot* (Salotra et al. 1999), com anticorpos específicos presentes em amostras de soros de pacientes que evoluíram para cura estável da LCL.

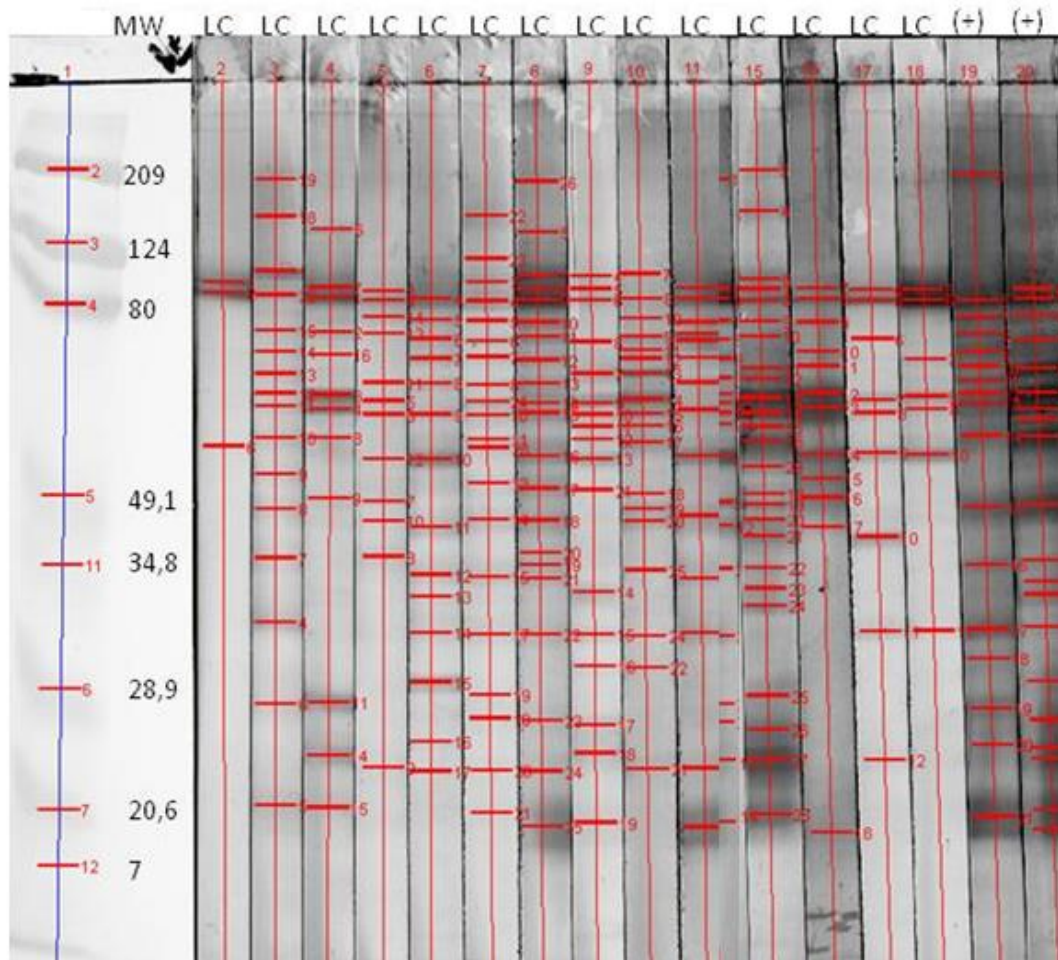


Figura 2: Identificação de frações imunodominantes de antígeno solúvel de *L. naiffi*, utilizando anticorpos provenientes de amostras de soros de voluntários com cura estável da LCL.

Esses resultados demonstraram que a faixa de tamanho molecular reconhecida pelo maior número de amostras de soros estava entre 35 e 70 KDa, sendo observadas reatividade com soros de 8 a 14 voluntários curados de LCL. Pode-se dizer, portanto, que essa é a faixa mais imunodominante (Fig.2 e fig. 3).

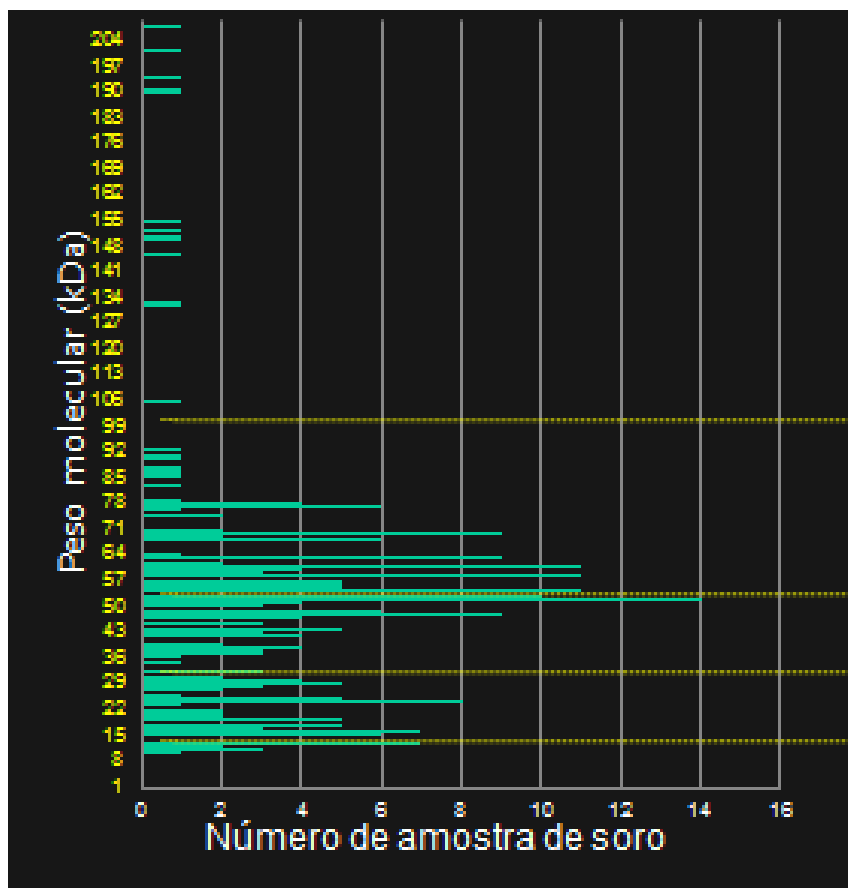


Figura 3: Frequência de reconhecimento das frações solúveis de *L. naiffi* por anticorpos de voluntários com cura estável da LCL.

Além disso, partindo-se do princípio que as espécies de *Leishmania* compartilham determinados peptídeos capazes de serem reconhecidos, cruzadamente, por soros de pacientes infectados por diferentes espécies do parasito (Reed et al. 1987), pode-se sugerir a possibilidade de desenvolver uma vacina contra diferentes espécies de *Leishmania*. Essa possibilidade vai ao encontro da necessidade real de uma vacina pan específica, para as leishmanioses, devido à ocorrência simpátrica de muitas espécies patogênicas.

Assim, este trabalho visa contribuir para o desenvolvimento biotecnológico de uma vacina inovadora através da vacinologia reversa, em que frações imunodominantes de espécies de *Leishmania* representantes dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* serviram de base para busca de potenciais candidatos vacinais. As informações aqui produzidas contribuirão para a produção de protótipos vacinais molecularmente bem definidos, cujas vantagens serão: 1) identificar potenciais antígenos capazes de induzir uma resposta humoral e celular bem modulada; 2) identificar potenciais antígenos que sejam

amplamente reconhecidos pela população humana heterogênea; 3) identificar potenciais antígenos que induzem uma resposta pan específica; 4) eliminar antígenos indutores de respostas imunes associadas à doença; 5) propôr antígenos que no futuro possam compor uma composição vacinal, com possibilidade de padronização em escala industrial e que permita rapidez e reprodutibilidade de produção; 6) propôr formulações vacinais que possam no futuro atender normas de qualidade preconizadas por órgão regulamentadores da qualidade e segurança, e conseqüentemente viabilizar futuros testes em fases clínicas de desenvolvimento da vacina.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar as proteínas imunodominantes presentes nas frações solúveis de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (LaAg(s)) e de *L. (V.) naiffi* (LnAg(s)) na busca de potenciais candidatos vacinais pan específicos para controle das leishmanioses.

3.2 Objetivos específicos

1. Isolar, por fracionamento em SDS-PAGE e caracterizar as frações imunodominantes dos antígenos solúveis LaAg(s) e LnAg(s), através de espectrometria de massas e análises de ontologia gênica e de similaridade entre as proteínas identificadas e as proteínas de hospedeiros;
2. Avaliar *in silico* o potencial de ligação e o grau de promiscuidade de epítomos imunodominantes a moléculas de HLA;
3. Avaliar *in silico* o potencial de reconhecimento de epítomos imunodominantes por receptores de antígenos de linfócitos B;
4. Analisar o grau de homologia/conservação das proteínas imunodominantes entre diferentes espécies de *Leishmania*.

4. METODOLOGIA

O fluxo de trabalho que ilustra essa metodologia encontra-se esquematizado nas figuras 4.1 e 4.2.

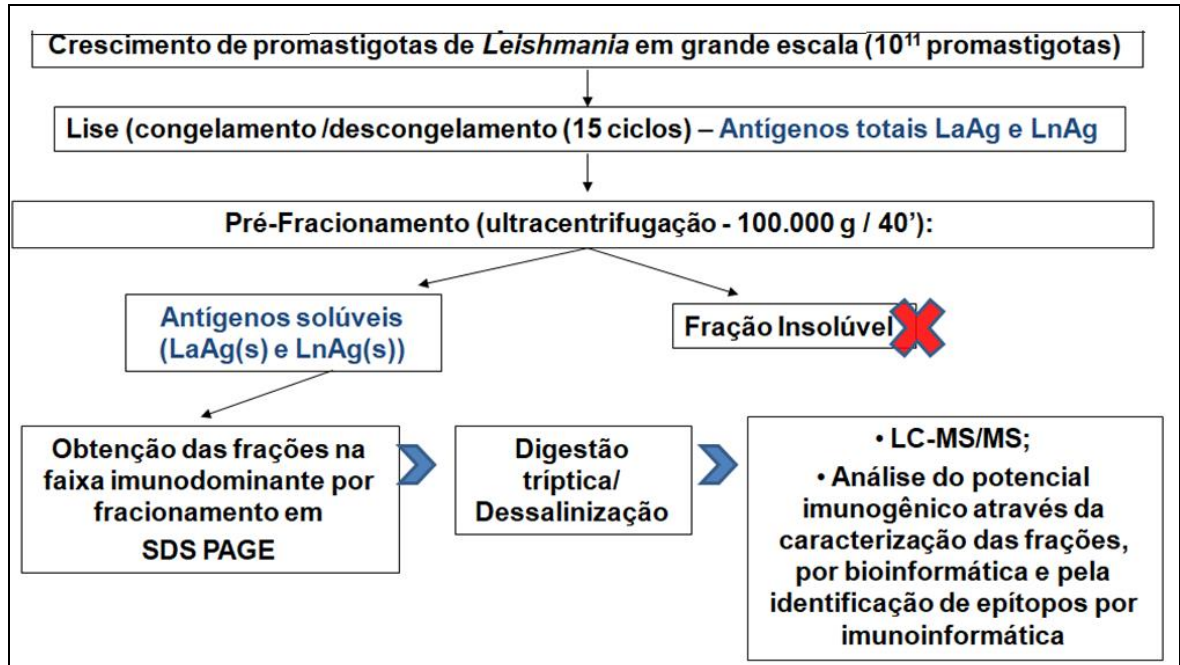


Figura 4.1: Fluxo de trabalho para obtenção de frações antigênicas imunodominantes de LaAg(s) e LnAg(s) e posterior análise proteômica e de bioinformática.

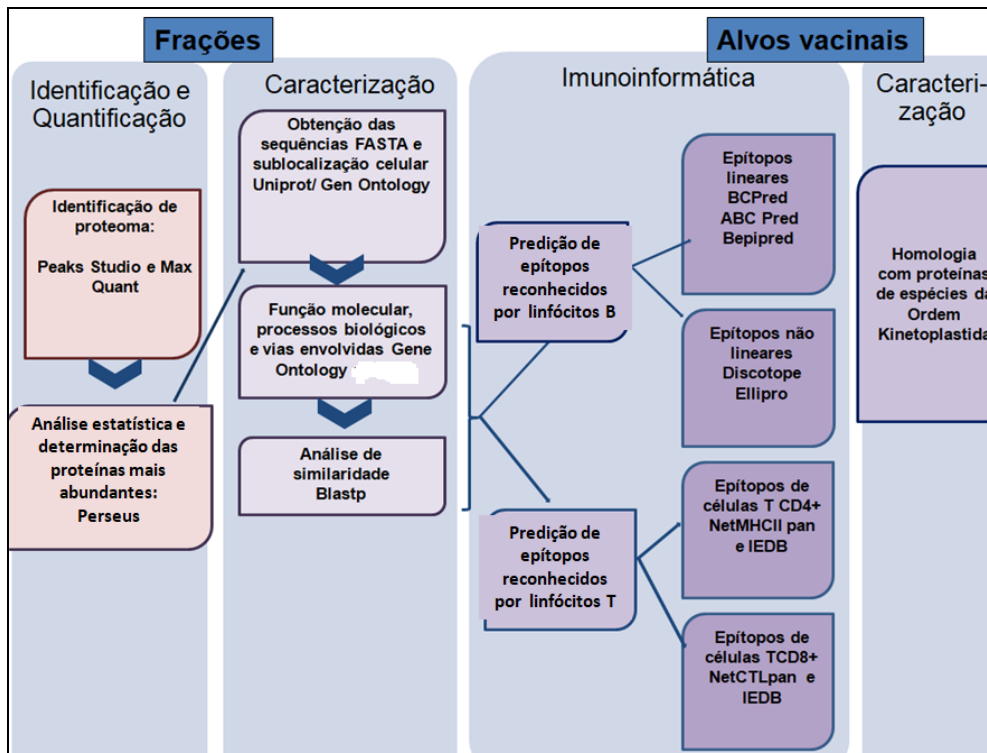


Figura 4.2: Fluxo de trabalho para análises de bioinformática das frações imunodominantes de LaAg(s) e LnAg(s).

4.1. Parasitos

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa MHOM/BR/75/Josefa) e de *L. (V.) naiffii* (MHOM/BR/2010/MS), foram cultivadas em meio Schneider (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB- Cultilab, São Paulo, Brazil), L-glutamina (1mM/mL), antibiótico (penicilina: 200U/mL; estreptomicina: 200µg/mL), em estufa sob temperatura de 26°C, durante 4 dias, até atingirem a fase estacionária de desenvolvimento (quarto dia de cultura). A cinética de replicação ao longo do tempo de cultura foi determinada previamente para cada espécie.

4.2. Preparo dos antígenos totais e das frações solúveis

Os antígenos totais foram preparados a partir de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (V.) naiffii*, no início da fase estacionária de crescimento (Pinto et al. 2003). Os parasitos foram centrifugados (3000 RPM por 15 minutos a 20°C) e lavados duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para retirar proteínas do SFB. O precipitado de parasitos foi ressuspensão em volume conhecido de PBS, contado em câmara de Neubauer, e, então, o volume da cultura foi ajustado a fim de se obter 2×10^8 promastigotas/mL. Essa suspensão foi submetida a 15 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, seguido de descongelamento sob agitação mecânica com auxílio de um homogeneizador tipo “vórtex”, para lise das formas parasitárias. Adicionou-se à essa preparação, inibidor de protease (*Complete protease inhibitor cocktail tablets* – Roche – número de catálogo 05892791001), de acordo com orientações do fabricante. A concentração proteica desses antígenos totais foi determinada pelo método colorimétrico, baseado em ácido biocinconinico (BCA, Thermo Scientific, Massachussets, EUA – Brown et al. 1989). Após esse procedimento, os antígenos totais foram aliquotados em microtubos, contendo 1mg/mL e armazenados a -20°C. Foram dadas as seguintes denominações aos mesmos: Antígenos totais de *L. (L.) amazonensis* (LaAg); antígenos totais de *L. (V.) naiffii* (LnAg).

A partir dos antígenos totais LaAg e LnAg foram produzidos os antígenos solúveis, denominados LaAg(s) e LnAg(s). Para isso, os antígenos totais foram submetidos à ultracentrifugação a 100.000g, por 30 minutos a 4°C, em ultracentrífuga Beckman Coulter (Califórnia, EUA). O sobrenadante contendo as frações solúveis foi separado do precipitado e filtrado, para esterilização, em membranas de 0,22 µm de *Polyvinylidene fluoride* (PVDF), com baixa capacidade de adesão a proteínas (Millipore, Massachusetts, EUA). A concentração proteica das frações solúveis foi determinada pelo método colorimétrico, baseado em BCA (*Thermo Scientific*), como descrito anteriormente. Foram feitas alíquotas de 500µL, em microtubos (Axygen – Corning *Inc.*, Massachusetts, EUA) e armazenados a -20°C. Esse procedimento foi repetido em três experimentos independentes.

4.3. Fracionamento dos antígenos solúveis por SDS-PAGE

Proteínas das frações solúveis LaAg(s) e LnAg(s) foram separadas por tamanho molecular em gel de 1mm, de dodecil sulfato de sódio e acrilamida-poliacrilamida (SDS PAGE) a 12%. A suspensão antigênica foi diluída em tampão de amostra 5X (Bio Rad), totalizando 25µg de proteínas, em cada tubo, na solução final. Todo o volume foi aplicado no poço. A mistura foi aquecida a 100 °C, em aquecedor para microtubos. A corrida eletroforética ocorreu sob a voltagem de 180 V, por cerca de 20 minutos, seguido por mais 40 minutos a 200 V. Os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue G-250* (BioRad, Califórnia, EUA), conforme descrito por Neuhoff *et al* (1988), por 10 minutos, e descorados com sucessivas lavagens com solução de metanol 10% e ácido acético 30%, com auxílio de agitador mecânico, até a máxima remoção do corante. Esses procedimentos foram realizados em 3 experimentos independentes, para a obtenção de 3 “N” de frações dos antígenos solúveis. Para cada um dos três experimentos independentes, os mesmos procedimentos descritos nesse tópico foram seguidos.

Imagens dos géis foram capturadas em densitômetro GS800 (BioRad), para documentação e auxílio na extração das bandas.

Dez bandas com tamanho molecular compreendido entre 35 kDa e 100 kDa (definido como faixa imunodominante do antígeno solúvel de *L.(V.) naiffi*, (a partir dos resultados prévios de *Immunoblot* com soro de voluntários curados de LCL) foram extraídas manualmente, com auxílio de bisturis, de cada antígeno subfracionado no gel.

Cada banda foi alocada em um microtubo de 1mL (Axygen), previamente tratado com metanol e H₂O tipo 1 e secos a 37°C, *overnight*.

4.4. Digestão e dessalinização de proteínas

As bandas foram tratadas por digestão com lavagens sucessivas em soluções de Tris 0,1M (pH8,5), uréia 8M e iodocetamida 0,05M, e incubados com tripsina previamente diluída (v5111 *Sequencing Grade Modified Trypsin* – 5X 20Ug, Promega, Wisconsin, EUA), respectivamente, como previamente descrito por Cuervo *et al* (2007). Os sobrenadantes dessa reação foram alocados em tubos de 500µL tratados com metanol e H₂O tipo 1, como descrito anteriormente.

Os produtos da digestão do gel foram ressuspensos em ácido trifluoroacético (TFA) 1%, para verificação de pH ácido. A dessalinização foi feita com ultrafiltrações das amostras proteicas em membranas C18 (*Empore™ Octadecyl C18, 47mm extraction disks* – Thermo Fisher), dispostas no interior de ponteiras, com soluções de acetonitrila 100% e de 0,1%, sucessivamente, em diferentes ciclos de centrifugação. Os eluatos finais foram recolhidos em tubos Axxygen previamente tratados e os peptídeos foram dosados pelo método *Qubit Protein Assay Kit* (Thermo Fisher). Foram feitas alíquotas com concentração de 30µg, que foram secas a vácuo em *speed vac*, à temperatura ambiente. As amostras foram armazenadas, até a análise por espectrometria de massa, em freezer a -20° C.

4.5. Espectrometria de massas

Espectros de massa foram obtidos a partir da análise das proteínas dos antígenos solúveis LaAg(s) e LnAg(s), na faixa de ~30kDa a ~100kDa, originadas do fracionamento por SDS PAGE. Utilizou-se colunas de 9 mm para nanocromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massa em nanoeletropulverização. O volume de 4 mL de digestão de peptídeo tríptico dessalinizado foi ressuspenso em TFA, em uma coluna de armadilha de 2 cm de comprimento (100 µm de diâmetro interno), embalada com 5µm de matriz Magic C18 AQ 200 A (Michrom Bioresources, EUA), seguido de separação em uma coluna de separação de 10 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, que foi embalada com Reprosil-Pur 120 C18_AQ de 1,9 µm diretamente em uma

coluna vazia de ponta de embalagem automática de 15 μm (caseira) usando um instrumento extrator a laser.

A cromatografia foi realizada em um instrumento EASY-nLC II (Thermo Scientific, EUA). As amostras foram carregadas na coluna de armadilha a 2000 nL / min, enquanto a separação cromatográfica ocorreu a 200 nl / min. A fase móvel A consistiu em 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água. A fase móvel B consistiu em 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila. As condições de gradiente foram as seguintes: 2 a 40% de B por 32 min e até 80% de B por 4 min. Esta concentração foi mantida por mais 2 minutos antes da coluna ser reequilibrada. Os peptídeos eluídos foram introduzidos diretamente em um LTQ XL/Orbitrap MS (Thermo, EUA) para análise. A fonte de voltagem foi ajustada em 1,9 kV, a temperatura capilar em 200°C e a voltagem da lente do tubo em 100 V. O valor total da armadilha de íons e o valor alvo do MSn AGC foram 30.000 e 10.000, respectivamente.

O valor da meta AGC total do transformador ciclotrônico de íons de Fourier (FTMS) foi definido como 500.000. Os espectros MS1 foram adquiridos no analisador Orbitrap (300 a 1.700 m/z) a uma resolução de 60.000 (para m/z 445.1200). Para cada espectro, os 10 íons mais intensos foram submetidos à fragmentação da dissociação induzida por colisão (CID), com sinal mínimo exigido de 10.000; largura de isolamento de 2,5; energia de colisão normalizada de 35,0; ativação Q de 0,25 e tempo de ativação de 30 s, seguido pela aquisição de MS2 no sistema linear analisador de armadilhas de íons. A opção de exclusão dinâmica foi ativada. As configurações dos parâmetros foram as seguintes: *repeat count* = 1; duração da repetição = 30 s; tamanho da lista de exclusões = 500; duração da exclusão = 45 se largura da massa da exclusão = 10 ppm. Assim, o tempo de corrida, para cada amostra, foi de 56 minutos.

4.6 Identificação de proteínas

Foi utilizado o *software Peaks Studio*, versão X (Tran et al. 2019), para identificação das sequências de proteínas de acordo com tutorial do desenvolvedor (*Bioinformatics Solutions Inc.*, disponível em <http://www.bioinfor.com/user-manual/>). Os espectros de massa foram comparados contra os bancos de dados customizadas de *Leishmania* do Uniprot (www.uniprot.org). Foram utilizados os parâmetros padrão (*default*) para esta análise, assim como a taxa máxima de identificações falsas (*false discovery rate* - FDR), que foi de 1%. Listas de identificação de proteínas e sequências das proteínas identificadas foram obtidas no formato FASTA, também através do Uniprot.

Para maior acurácia dos resultados, as proteínas também foram identificadas utilizando o *software* MaxQuant, versão 1.6.0.16 (Cox et al. 2008 e Tayanova et al, 2016), também contra a base de dados UniProt. Desta forma o banco de dados continha mais de 100.000 sequências de proteínas (junho de 2019 e novembro de 2019), a partir do UniProt, juntamente com as sequências “decoy” (sequências originais das proteínas oriundas do UniProt escritas automaticamente de maneira reversa). Este banco de dados foi complementado ainda com contaminantes frequentemente observados em experimentos de proteômica (tripsina, porcina, lisil endopeptidase de *Achromobacter lyticus*, e queratinas humanas) e também com suas sequências invertidas. Os parâmetros de pesquisa foram os seguintes: uma tolerância no MS de 5 ppm, uma tolerância no MS/MS de 10 ppm, duas clivagens perdidas da tripsina, carbamidometilação de cisteína definida como uma modificação fixa e oxidação de metioninas e acetilação N-terminal definidas como modificações variáveis. Os FDRs foram calculados com base no número de vezes que o software identifica as proteínas na base de dados decoy. Assim foi usado como critério de confiabilidade de identificação um FDR de 0,01 (1%).

Os dados gerados foram exportados para Excel, em forma de tabelas de proteínas. Foi procedida a consolidação das listas de proteínas identificadas pelos métodos *Peaks Studio* e *MaxQuant*, em uma única lista, com proteínas identificadas com 2 ou mais peptídeos únicos e consolidadas. Proteínas identificadas com um peptídeo único foram retiradas da lista.

O mesmo procedimento foi feito para as amostras de três experimentos diferentes, de fracionamento em gel (N1, N2 e N3).

O número total de proteínas identificadas foi comparado com os proteomas referência (proteomas de organismos modelos mais estudados): *L. major* cepa MHOM/IL/81/Friedlin- ID Uniprot do proteoma: UP000000542, para o subgênero *Leishmania*, e *L. braziliensis* cepa MHOM/BR/75/M2904, – ID Uniprot do proteoma UP000007258, para o subgênero *Viannia*, que estão disponíveis em <https://www.uniprot.org/proteomes/?query=leishmania&sort=score> (Ivens et al. 2005; Rogers et al. 2011 e Peacock et al. 2007).

4.7. Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada sem marcação (LFQ), habilitando a ferramenta LFQ do programa MaxQuant, a qual é baseada na intensidade dos espectros de massa.

A comparação e análise estatística das diferenças em abundância das proteínas identificadas em cada condição foi feita usando o *software* Perseus versão 1.6.1.3. Para validação e análise estatística das diferenças foram consideradas apenas as proteínas identificadas em pelo menos duas das três replicatas biológicas em cada grupo. Aplicamos o teste t de *Student* para comparar entre os grupos, aceitando diferenças com FDR de 0,05 (5%).

Apenas as proteínas mais abundantes nas duas frações solúveis imunodominantes foram selecionadas para as análises subsequentes.

4.8. Análise de anotação funcional

A fim de se caracterizar o conjunto de proteínas presentes nas frações imunodominantes selecionadas, foi feita a análise ontológica das frações. Nessa análise foram preditas a localização celular, a função molecular, os processos biológicos e as vias metabólicas em que as proteínas estão envolvidas. Tal análise foi feita através do banco de dados e ferramentas do vocabulário controlado *Gene Ontology*, disponível em <http://geneontology.org> (GeneOntology Consortium 2010).

4.9. Análise de similaridade entre proteínas quantificadas e proteínas de mamíferos

Com objetivo de eliminar, das análises posteriores, proteínas com alta similaridade de sequência ou com similaridade estrutural a proteínas humanas, de cão ou de hamster, foi verificada a similaridade das proteínas mais abundantes dos antígenos LaAg(s) e LnAg(s) com as proteínas dos mamíferos citados (*Homo sapiens*, taxid 9606; *Mesocricetus auratus*, taxid 1036; *Canis lupus familiaris*, taxid 9615). Para essa análise foi utilizada a ferramenta *Basic Alignment Search Tool* (BLAST), disponível no site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os valores de similaridade, para cada organismo, com menor valor de erro padrão (*e-value*) abaixo de 0,05, maior percentual de cobertura e maior *score*, foram selecionados, com arredondamento para valores inteiros, eliminando-se as casas decimais. Não foram considerados resultados com *e-value* maiores que 0,05.

As sequências analisadas nessas condições, cujo resultado foi “nenhuma similaridade significativa encontrada”, foram reanalisados pelo mesmo programa. Para aumentar a resolução na análise dessas sequências com alteração da matriz Blosum 62, para PAM

250, que de acordo com Baxevanis & Ouelette (2005), é ideal para alinhamentos de sequências curtas e com baixa similaridade (~20-30% de identidade (ID)). Também foi utilizado o filtro para “regiões de baixa complexidade”, como um dos parâmetros do algoritmo, como recomendado pelo próprio programa, para esses casos. Foi considerada a classificação de Rost (1999) e Chung et al. (1996), para essa análise, que consiste em:

- Alta similaridade: > 40% ID;
- Estruturalmente similar: entre 30% e 40% ID;
- Baixa similaridade: entre 25% e 30% ID;
- Similaridade muito baixa (*twiligh zone*): entre 20 e 25% ID;
- Sinal de similaridade impreciso (*midnight zone*): < ou = a 20% ID.

Dessa forma, as proteínas com valores iguais ou menores que 30% de identidade (baixa similaridade ou sem similaridade significativa) foram selecionadas para análise pelos demais métodos, sendo consideradas preferencialmente adequadas como alvos vacinais.

4.10. Predição de epítomos lineares e não lineares reconhecidos por linfócitos B

Foi realizada a predição de epítomos potencialmente reconhecidos por linfócitos B naquelas proteínas de *Leishmania* cuja similaridade com antígenos humanos foi menor que 30%. Essa análise busca contribuir, juntamente com outras análises, para a identificação das proteínas potencialmente mais imunodominantes através da predição de reconhecimento por anticorpos (receptores de antígenos de linfócitos B - BCR).

Os epítomos lineares de células B constituem apenas cerca de 10% dos potenciais epítomos, sendo, cerca de 90%, epítomos conformacionais (Pellequer et al. 1991). Assim, foi realizada a predição de potenciais epítomos lineares e conformacionais, pelos seguintes servidores:

a) **BEPIPRED, versão 2.0** (Jespersen et al. 2017). Este preditor determina epítomos lineares de alta afinidade, a partir de estruturas cristalizadas de complexos antígeno-anticorpo. Essa ferramenta está disponível na plataforma “*Immune Epitope Database and Analysis Resource* – IEDB (<http://tools.iedb.org/bcell/>), que também cataloga dados experimentais de epítomos de células T e B, estudados em humanos, primatas não humanos e outros animais (Vita et al. 2019). Foram aceitos valores de predição de acordo com o padrão do servidor (0,5), relacionado a valores de sensibilidade

e de especificidade de 0,59 e de 0,58, respectivamente. Foram considerados apenas epítomos com 9 ou mais aminoácidos, conforme parâmetro padrão do programa. Os dados gerados foram referentes à quantidade total de epítomos lineares e com alta afinidade em cada proteína.

b) **BCPRED**, disponível em www.ailab.ist.psu.edu (Saha et al. 2005, El-Manzalawy et al. 2008 e Leow et al. 2020). As proteínas analisadas por esse programa são comparadas com epítomos validados experimentalmente, que compõem os bancos de dados não redundantes Beiped (Saha et al. 2005). Sequências aleatórias baseadas nas estatísticas do banco de dados Swiss-prot são usadas como controle negativo (não epítomos) desta análise. Os critérios desta análise foram as seguintes propriedades físico-químicas: hidrofobicidade (Parker et al. 1986); flexibilidade (Karplus et al. 1985 apud Vihinen 1994), acessibilidade (Emini et al. 1985), rotação (Chou et al. 1978 e Pellequer et al. 1993), exposição na superfície (Janin et al. 1978) e antigenicidade (Kolaskar et al. 1990). Foi usado o *threshold* de 2,38 (padrão), para a análise das combinações das propriedades físicoquímicas das proteínas, cujo grau de proximidade entre a sequência predita e a validada experimentalmente (acurácia) corresponde a 58,7%.

c) **ABC Pred** (Saha & Raghava 2006), que utiliza a tecnologia de Rede Neural Artificial (*Artificial Neural Networks* – ANN). A aprendizagem da máquina se baseia em epítomos de tamanho fixo, que compõem um conjunto de dados de peptídeos, de cerca de 700 epítomos e 700 não epítomos, escolhidos randomicamente do banco de dados Becipep. Dentre as opções disponibilizadas pelo programa foram escolhidos peptídeos de tamanho 16 mer, como alvos da predição, por ser o tamanho padrão do programa. A acurácia desse programa corresponde a 65,93%.

d) **Ellipro** (Ponomarenko et al. 2008) – Esse programa foi utilizado para a predição de epítomos lineares e descontínuos de células B. Por isso, nesse estudo, consideramos esse programa como sendo dois preditores. Sua análise se dá pela localização de cada resíduo de aminoácido na estrutura 3D. Os epítomos descontínuos previstos pelo ElliPro são agrupados com base na distância R em Å entre dois centros de massa de resíduos localizados fora do maior elipsóide possível. Quanto maior o valor de R, maior será o número de epítomos descontínuos agrupados.

e) **Discotope, versão 2.0** (Kringelum et al. 2012), disponível na plataforma IEDB (<http://tools.iedb.org/discotope/>). Esse programa identifica epítomos não lineares de células B, a partir da estrutura tridimensional das proteínas. O resultado final é uma combinação de *scores* de duas características dos aminoácidos: propensão (probabilidade de ser um aminoácido catalítico) e acessibilidade à superfície.

As entradas foram feitas com identificadores das estruturas cristalizadas das proteínas, obtidas no *World Wide Protein Data Bank* (PDB), para cada cadeia da respectiva estrutura terciária ou quaternária. Foi utilizado o *threshold* padrão (*default*) do programa, de -7,7, que corresponde a uma especificidade de 75%. Assim, foram considerados positivos para a predição, resíduos de aminoácidos com *score* maior que o *threshold*.

As proteínas não modeladas, para as quais não foram encontradas estruturas tridimensionais, não foram analisadas pelos preditores Ellipro e Discotope. Por isso, não foi possível analisar grande parte das proteínas e os dados gerados por esses programas não foram considerados eletivos para a seleção de proteínas potencialmente mais imunogênicas. Porém, foram considerados descritivos.

Os dados de todas as predições de epítomos lineares e não lineares de células B, foram tabulados em *Excel*. As proteínas com epítomos preditos em, pelo menos, 4 dos 6 preditores de epítomos lineares foram consideradas potencialmente mais imunogênicas, não sendo, necessariamente, considerados os mesmos epítomos de cada proteína, nos respectivos programas, mas as mesmas proteínas, com maior número de epítomos. A representação da estrutura tridimensional de cada proteína mais imunogênica, dentre as analisadas, foi obtida pelo programa Discotope, com a localização dos epítomos reconhecidos por células B.

4.11 Predição de epítomos reconhecidos por linfócitos T

4.11.1. Predição de Epítomos ligantes a HLA de classe II

A predição de epítomos ligantes de HLA de classe II foi feita para os alelos com a maior frequência na população em geral (Greenbaum et al. 2011), conforme indicado no quadro 4.1.

Quadro 4.1: Antígenos leucocitários humanos (HLA DR, HLA DQ e HLA DP) considerados para análise de ligação de peptídeos contidos em LaAg(s) e LnAg(s)

<i>Locí gênicos</i>	DR	DQ	DP
Alelos	HLA-DRB1*01:01	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01	HLA-PA1*02:01/DPB1*01:01
	HLA-DRB1*03:01	HLA -DQA1*05:01/DQB1*03:01	HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01
	HLA-DRB1*04:01	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	HLA-PA1*02:01/DPB1*05:01
	HLA-DRB1*07:01	HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	HLA-PA1*02:01/DPB1*14:01
	HLA-DRB1*08:02	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	
	HLA-DRB1*11:01	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	
	HLA-DRB1*12:01		
	HLA-DRB1*13:01		

HLA-DRB1*15:01
 HLA-DRB3*01:01
 HLA-DRB3*02:02
 HLA-DRB4*01:01
 HLA-DRB5*01:01

Essa análise foi feita pelo programa *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB), disponível em www.iedb.org (Vita et al. 2018). Foi utilizada a ferramenta “*Consensus*” (Kim et al. 2012). Foram preditos peptídeos com tamanho de 15 aminoácidos para HLA classe II, conforme parâmetro padrão do programa.

A confirmação da análise dos peptídeos ligantes a HLA de classe II foi feita usando-se o servidor NetMHCIIpan-3.2, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/> (Jensen et al. 2018). Esse programa utiliza o banco de dados IEDB e a predição dos peptídeos é dada pela comparação com os valores de força de ligação de 200.000 peptídeos randômicos, do mesmo tamanho que o peptídeo analisado. Com base no *threshold*, esses peptídeos são classificados em ligantes fortes ou fracos. Foram utilizados os parâmetros padrão do programa, para a análise. Ou seja: *percentile rank* para “ligadores fortes”, de 2% e para ligadores fracos, de 10%.

4.11.2. Predição de Epítomos ligantes a HLA de classe I

A predição de epítomos promíscuos foi feita para os alelos de HLA classe I, descritos no quadro 4.2:

Quadro 4.2: Antígenos leucocitários humanos (HLA A e HLA B), para análise de ligação de peptídeos dos antígenos LaAg(s) e LnAg(s)

<i>Locí gênicos</i>	A	B
Alelos	HLA-A*01:01	HLA-B*07:02
	HLA-A*02:01	HLA-B*08:01
	HLA-A*02:03	HLA-B*15:01
	HLA-A*02:06	HLA-B*35:01

HLA-A*03:01	HLA-B*40:01
HLA-A*11:01	HLA-B*44:02
HLA-A*23:01	HLA-B*44:03
HLA-A*24:02	HLA-B*51:01
HLA-A*26:01	HLA-B*53:01
HLA-A*30:01	HLA-B*57:01
HLA-A*30:02	HLA-B*58:01
HLA-A*31:01	
HLA-A*32:01	
HLA-A*33:01	
HLA-A*68:01	
HLA-A*68:02	

Para essa análise também foi utilizado o banco de dados IEDB, descrito anteriormente e, conforme parâmetro padrão, foi feita a predição de peptídeos de tamanho de 9 aminoácidos.

A análise de peptídeos ligantes a HLA de classe I também foi feita pelo programa NetCTLpan1.1 (Stranzl et al. 2010), disponível em <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetCTLpan-1.1>, cujo score baseia-se na soma de valores de cobertura populacional teórica, clivagem proteossomal, eficiência de transporte associado a processamento de antígeno (*TAP*) e força de ligação a HLA de classe I. Os parâmetros utilizados para seleção dos epítomos foram os padrões do programa (tamanho do peptídeo: 9 aminoácidos; peso na clivagem da porção C terminal da proteína: 0,225; peso na eficiência de transporte (*TAP*): 0,025 e limite (*threshold*) para identificação de epítomos (1,0).

Os alelos de HLA classe I e de HLA classe II, indicados, foram descritos como representativos das principais variantes dos *loci* de HLA e ocorrem em cerca de 98% da população humana, ao redor do mundo, em todos os continentes. Dentre esses alelos, alguns são predominantes em populações de áreas endêmicas para o subgênero *L. Viannia*, como América do Sul e América do Norte (Llanes et al. 2018). Os peptídeos “consenso”, com scores de ligação (*percentile rank*) menores que 0,75 e $Ic50 > 1$ nm, para HLA classe I ou para HLA classe II, foram considerados para análises subsequentes.

Os resultados dessas análises foram importados para tabela de *Excel* (números de peptídeos por alelo de HLA).

Os resultados das análises de similaridade e de imunoinformática tiveram como parâmetros de comparação, proteínas vacinais, bem caracterizadas imunologicamente. Assim, foram considerados controles dessas análises, os antígenos *Circunsporozoite protein* de *Plasmodium falciparum*; o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg); e a *Diacylglycerol acyltransferase/mycolyltransferase Ag85A* (*Mycobacterium bovis*).

4.12 Seleção de proteínas candidatas vacinais

De forma independente, foram selecionadas 10 proteínas de cada análise de epítomos, com base nos seguintes critérios: maior número de epítomos lineares reconhecidos por células B em pelo menos 4 de 6 preditores; maiores números de potenciais epítomos ligantes de HLA classe I ou de HLA classe II e maior promiscuidade quanto à ligação ao HLA. O conjunto dessas proteínas foi ordenado do maior ao menor, de acordo com o número de epítomos ligantes ao HLA classe II. Na mesma tabela foram descritos os dados das proteínas empregadas como controles. Aos dados relacionados às predições de epítomos, foram acrescentados os dados de abundância, similaridade a proteínas humanas, e tamanho da sequência. As proteínas com maior número de epítomos preditos ligantes ao HLA classe II, HLA classe I e reconhecidos por BCR, concomitantemente, foram selecionadas para as análises subsequentes.

Imagens em formato JSmol, das estruturas tridimensionais das proteínas que atenderam a todos os critérios estabelecidos nesse estudo e que foram selecionadas como alvos vacinais, foram obtidas através do programa Ellipro, a partir de suas ID PDB. Nessas imagens também estão indicados os epítomos conformacionais reconhecidos por células B, marcados em amarelo.

4.13. Análise de homologia

Considerando que a simpatria de diferentes espécies de *Leishmania* é comum em regiões endêmicas, um protótipo vacinal espécie-específico pode não ser capaz de induzir proteção satisfatória contra as leishmanioses numa população endêmica. Portanto, um dos critérios considerados para a identificação de alvos vacinais foi avaliar o grau de homologia de epítomos entre algumas das principais espécies de *Leishmania*

relacionadas a casos nas principais áreas endêmicas do mundo. Essa análise busca estabelecer alvos vacinais que sejam pan específicos para o gênero *Leishmania*.

Foi predita homologia das proteínas selecionadas nesse estudo, contra proteínas de 7 parasitos do gênero *Leishmania* (3 do subgênero *Viannia* e 4 do subgênero *Leishmania*).

A análise de homologia das proteínas mais imunodominantes e mais imunogênicas, de acordo com os preditores, foi feita por meio do programa eggNOG genes, versão 5.0 - *Evolutionary genealogy of genes: no-supervised Orthologous group* (Huerta-Cepas 2019), a fim de se identificar espécies de *Leishmania* que apresentam proteínas ortólogas às analisadas. O eggNOG é um dos bancos de dados de grupos ortólogos mais abrangentes, elaborado com uma abordagem funcional dos genes, com dados de 5090 organismos e 4,4 milhões de grupos ortólogos (acesso em 2020).

Ainda foi utilizado o banco de dados OrthoDB, versão 10.1 que também cataloga hierarquicamente e funcionalmente genes ortólogos (Kriventseva et al. 2019). O OrthoDB apresenta, no momento, dados sobre 1271 eucariotos, 6013 procariotos e 37 milhões de genes (acesso em 2020). As entradas das proteínas foram feitas com seus respectivos identificadores Uniprot, contra o táxon alvo Ordem Kinetoplastida e os resultados relacionados a espécies patogênicas de interesse foram dispostos em tabela de *Excel*.

Foram escolhidas proteínas com predição de um total mínimo de 5 proteínas homólogas em 5 espécies de *Leishmania*.

5. Resultados

5.1. Identificação proteômica e análise de bioinformática das frações imunodominantes dos antígenos LaAg(s) e LnAg(s)

5.1.1. Fracionamento de antígenos solúveis em gel SDS PAGE e identificação de proteínas

Os antígenos solúveis LaAg(s) e LnAg(s) foram resolvidos por SDS-PAGE e posteriormente foram cortadas 10 bandas na faixa entre entre 35 kDa e 100 kDa, a qual representa a fração imunodominante previamente identificada com soros de voluntários curados de LCL (Fig.5.1).

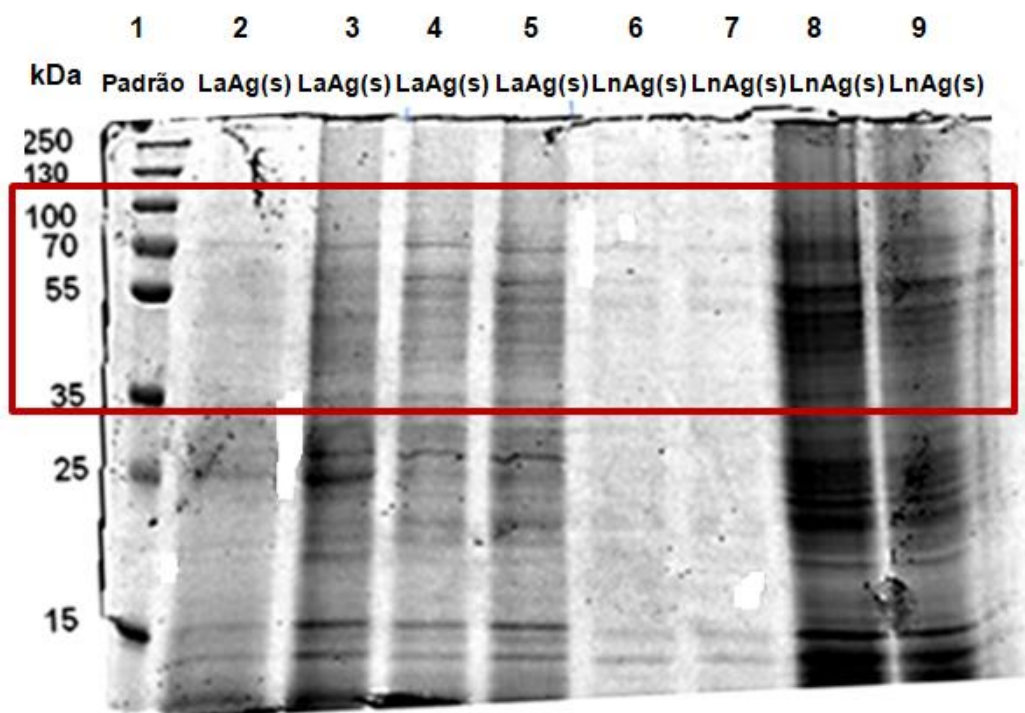


Figura 5.1: Fracionamento de antígenos LaAg(s) e LnAg(s), por gel de eletroforese. A linha 1, define os padrões de peso molecular. Nas linhas de 2 a 5, estão as corridas e replicatas biológicas da fração LaAg(s) e nas linhas 6 a 9 foram carregadas proteínas das diferentes replicatas biológicas de LnAg(s). Dez (10) bandas presentes na faixa de frações imunodominantes (aproximadamente entre 35 kDa a 100 kDa), delimitadas pelo retângulo em vermelho, foram cortadas manualmente e submetidas à digestão triptica. Como as proteínas nas linhas 6 e 7 estavam muito diluídas, as bandas desses dois experimentos foram misturadas e procesadas juntas.

Através da análise dos espectros de massa pelo programa *Peaks Studio* de amostras obtidas em 3 experimentos independentes (N1, N2 e N3), foram identificados 968 grupos de proteínas de LaAg(s) e 1061 de LnAg(s) inseridas na faixa imunodominante. A identificação das proteínas das frações antigênicas foi feita, utilizando-se, como um dos critérios a presença de pelo menos 2 peptídeos únicos em cada sequência. 63,5% das proteínas foram identificadas com mais de dois peptídeos únicos para LaAg(s) e 69% para LnAg(s). As duas listas de subfrações antigênicas, após serem curadas manualmente, para retirada das redundâncias entre as subfrações, apresentaram 331 proteínas em comum (Fig. 5.2).

Além da análise anterior, os espectros de massa também foram analisados usando o programa Max Quant, com o qual foram identificados 779 grupos de proteínas em

LaAg(s) e 893 em LnAg(s). Desses, 519 grupos de proteínas foram comuns aos dois antígenos (Fig. 5.2).

No total, consolidando-se as duas listas de proteínas identificadas de cada método (retirando-se as redundâncias), foram identificados 1340 grupos de proteínas de LaAg(s) e 1690 proteínas de LnAg(s) (Fig. 5.2). Em ambos os métodos, foi possível identificar mais proteínas de LnAg(s) que de LaAg(s). Os dois métodos apresentaram pouca diferença no número de proteínas identificadas em cada fração.

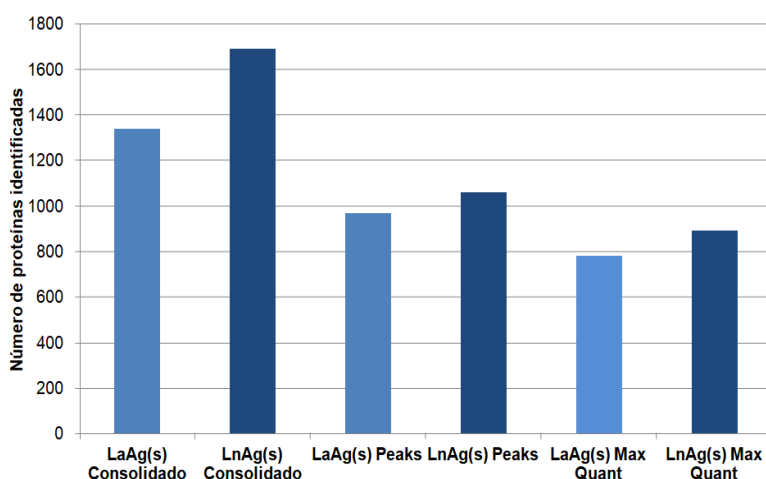


Figura 5.2: Identificação de proteínas presentes na faixa imunodominante dos antígenos solúveis LaAg(s) e LnAg(s). As barras representando “LaAg(s) consolidado” e “LnAg(s) consolidado” representam o somatório total dos grupos de proteínas, identificadas pelos programas Peaks Studio e MaxQuant, retirando-se as redundâncias entre as listas de proteínas geradas para cada antígeno.

Comparados aos proteomas de cepas referências dos respectivos subgêneros, as proteínas identificadas no antígeno LaAg(s) corresponderam a 17% do proteoma referência do subgênero *Leishmania*, representado pela cepa *L. major* (MHOM/L/81/FriendIn), que conta com um total de 8038 proteínas registradas. As proteínas identificadas em LnAg(s) corresponderam a 21% do proteoma referência do subgênero *Viannia*, representado pela cepa *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2904), com 8084 proteínas anotadas (Fig. 5.3). A comparação foi feita com os proteomas referências dos subgêneros, pois, até o momento, os proteomas preditos para *L. amazonensis* e *L. naiffi* não estão disponíveis no banco de dados Uniprot.

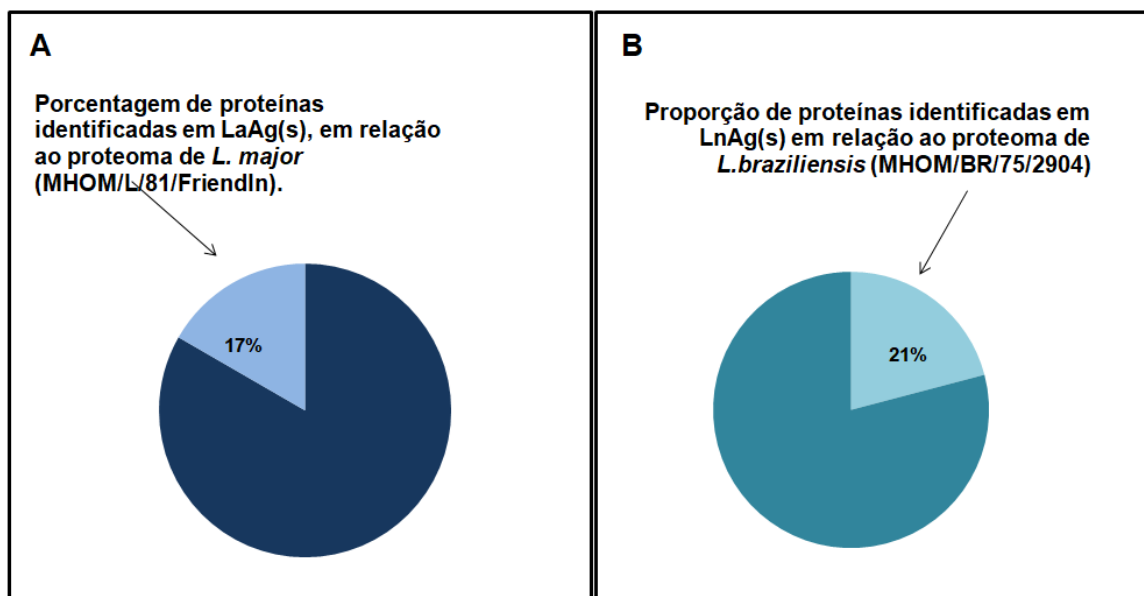


Figura 5.3: Percentual de proteínas identificadas em relação a proteomas referência dos respectivos subgêneros – *Leishmania* e *Viannia*. Comparação qualitativa, considerando-se apenas a identificação das proteínas.

.5.1.2. Análise de abundância

Usando o programa Perseus foi feita uma validação das proteínas que foram consistentemente identificadas entre os grupos (considerando que elas apareceram em pelo menos 2 das três replicatas para cada espécie). Esta análise estridente resultou na identificação de 337 grupos de proteínas, 94 dos quais foram identificados consistentemente apenas em LnAg(s), 109 apenas em LaAg(s) e 125 em ambos os antígenos (Fig.5.4).

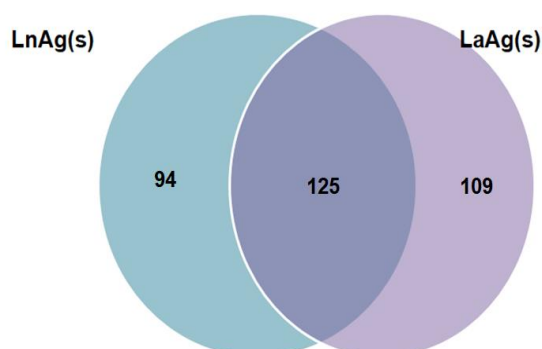


Figura 5.4: Gráfico de Venn representando os grupos de proteínas identificados e validados estatisticamente nos antígenos LaAg(s) e LnAg(s). A interseção representa proteínas comuns as duas espécies

Além disso, os valores de LFQ para cada um desses grupos de proteína foram calculados no programa Max Quant a partir das intensidades dos espectros de massas com o intuito de obter uma ideia da abundância relativa dessas moléculas na amostra. Esses grupos de proteínas foram então ordenados de maior a menor de acordo com o valor LFQ.

A proteína mais abundante nas frações imunodominantes dos antígenos solúveis foi a *Putative heat-shock protein hsp70* (ID Uniprot E9B099), presente em ambos os antígenos. Comparando-se com a lista das 20 proteínas mais abundantes no subgênero *L. Viannia* (Pinho et al. 2020), essa proteína é a 10ª mais abundante no subgênero.

Outras proteínas mais abundantes nas frações analisadas estão listadas na tabela 5.1. Todas essas são comuns aos dois antígenos e apresentaram o mesmo valor médio de quantificação.

Tabela 5.1: Dez proteínas mais abundantes nas frações imunodominantes de LaAg(s) e LnAg(s), de acordo com o valor LFQ

Rank	Antígeno	Grupo de proteína	ID Uniprot	LFQ*
1	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Putative heat-shock protein hsp70</i>	E9B099	31
2	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial</i>	A4HIH8	30
3	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Elongation factor 2</i>	E9ASD6	29
4	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	A7YBW7	29
5	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Putative heat shock protein</i>	E9ARS1	28
6	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Putative glucose-regulated protein 78</i>	A4HGG7	28

7	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Polyadenylate-binding protein (PABP)</i>	E9BSU0	28/30
8	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Heat_shock_protein_83</i>	A0A3P3ZG22	28
9	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Calreticulin</i>	E9B259	28/29
10	LaAg(s) e LnAg(s)	<i>Uncharacterized protein</i>	E9AML1	28

Total

10 proteínas

*LFQ - traduzido do inglês, significa “quantificação livre de marcação” é um método analítico para quantificar proteínas em diferentes amostras, a partir das intensidades dos espectros de massa, entre replicatas técnicas e biológicas.

5.2 Análise de anotação funcional

5.2.1 Localização subcelular

Foram preditas as localizações subcelulares de 52 proteínas identificadas em cada fração antigênica. Ou seja, apenas 22% das proteínas do antígeno LaAg(s) e 23% do LnAg(s) têm sua localização celular anotada em bancos de dados. Portanto, esses resultados caracterizam apenas uma pequena parte dos grupos proteicos antigênicos analisados.

Como esperado nas frações antigênicas solúveis de ambos os antígenos, a maior parte das proteínas foram encontradas no citoplasma, seguida pela localização no núcleo, e compondo estruturas relacionadas à tradução gênica (Fig. 5.5). Esse achado indica o envolvimento dessas moléculas em síntese de proteínas. No nosso conjunto de identificações foram encontradas poucas proteínas de membrana plasmática. Os componentes celulares nas frações analisadas estão representados no gráfico abaixo (Fig. 5.5).

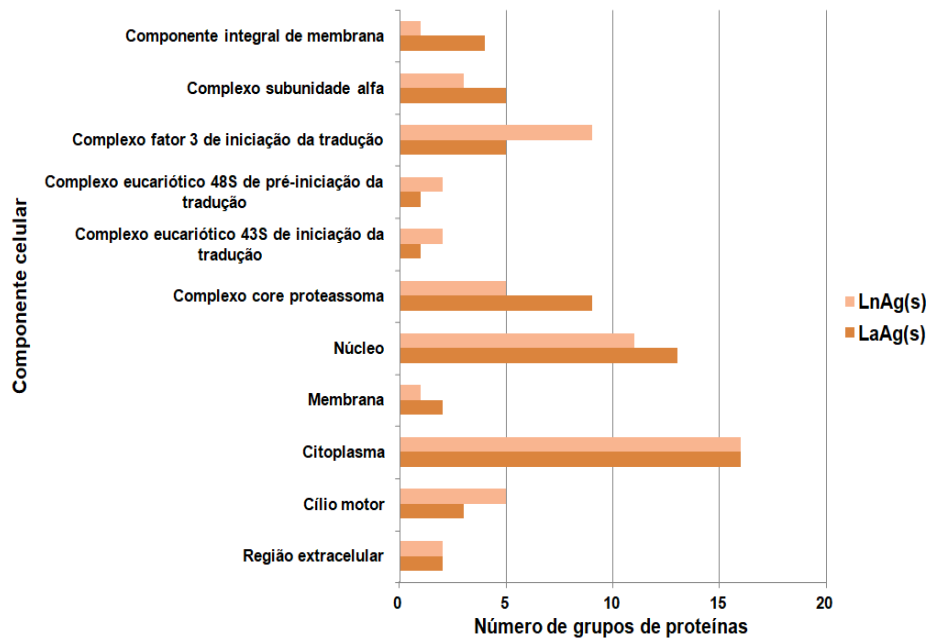


Figura 5.5: Principais sublocalizações celulares preditas no *Gene Ontology* para as proteínas identificadas em LaAg(s) e de LnAg(s).

5.2.2 Vias metabólicas

Foi possível prever as vias metabólicas de apenas 13 grupos de proteínas de LaAg(s) e de 12 de LnAg(s). A anotação das vias associadas aos demais grupos de proteínas não foi encontrada em nenhum dos bancos de dados acessados em julho de 2020. Por outro lado, quase todas as proteínas relacionadas apresentaram associação com mais de uma via anotada.

A análise demonstrou que a maior parte das proteínas analisadas está associada à degradação de carboidratos e à glicólise, nos dois antígenos. As vias seguintes que mais apresentaram proteínas relacionadas foram a via de síntese de aminoácidos, em LnAg(s) e a via das pentose-fosfato em LaAg(s). As vias metabólicas de pirimidina e de purinas, biossíntese de colesterol e de esteroides foram anotadas apenas para proteínas de LaAg(s) e as de degradação de aminoácidos, apenas para proteínas de LnAg(s), no conjunto de proteínas estudado (Fig. 5.6).

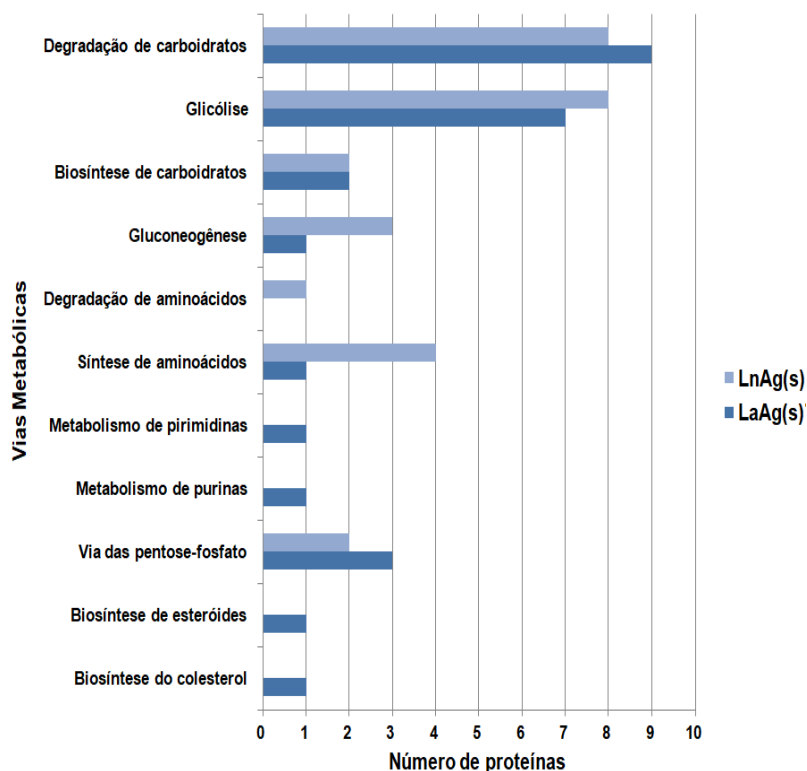


Figura 5.6: Vias metabólicas associadas a proteínas abundantes em LaAg(s) e em LnAg(s).

5.2.3. Processos biológicos

Foram identificados 83 processos biológicos, sendo 67 associados a 88 proteínas de LaAg(s) e 57 associados a 72 proteínas de LnAg(s). E desses, 33 processos foram preditos apenas para proteínas de LaAg(s) e 16 apenas para proteínas de LnAg(s), sendo 34 processos preditos para ambas as frações. Diversas proteínas apresentaram-se em mais de um processo biológico.

Por não serem anotados os processos biológicos de grande parte das proteínas analisadas, esse resultado é representativo de 38% dos grupos de proteínas de LaAg(s) e de 32% de LnAg(s). E por se basear em dados experimentais descritos na literatura, os algoritmos usados indicam os processos biológicos apenas nas proteínas mais estudadas desses antígenos. Os processos mais expressivos em números de proteínas, para, pelo menos uma das subfrações, foram representados em gráfico (fig. 5.7).

A biosíntese de aminoácidos e os processos relacionados ao catabolismo de proteínas foram os mais preditos em LaAg(s), sendo associados a um maior número de proteínas, enquanto que proteínas da fração imunodominante de LnAg(s) tiveram mais

predições de processos associados à produção de energia, tradução e processamento de proteínas.

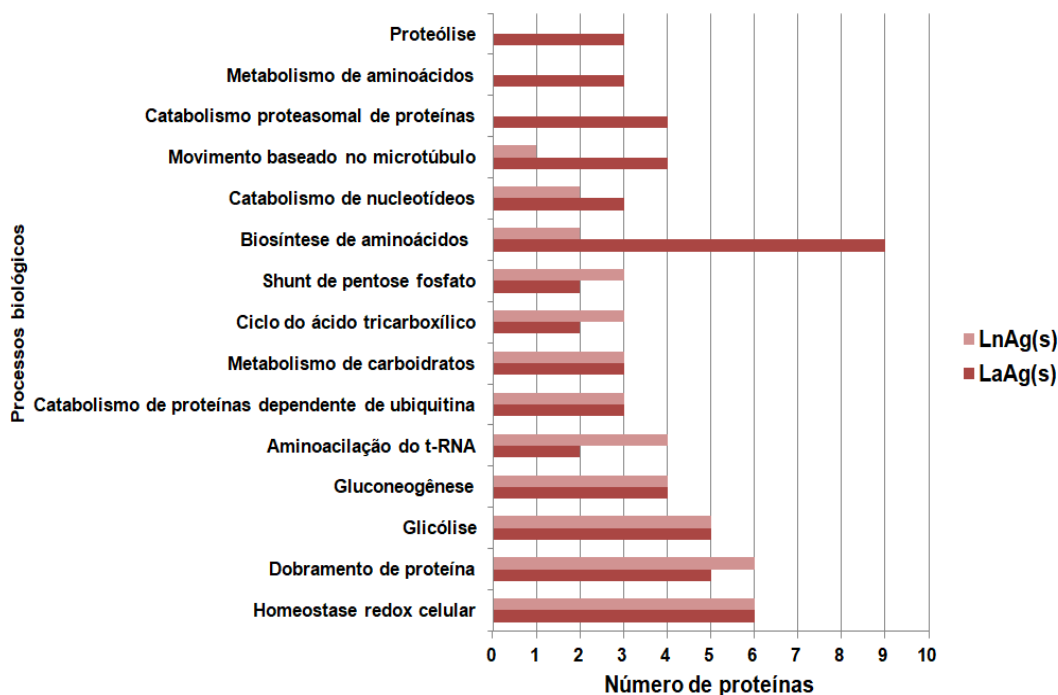


Figura 5.7: Principais processos biológicos relacionados às proteínas das frações de LaAg(s) e de LnAg(s).

5.2.4. Função molecular

Foram identificadas 289 funções moleculares relacionadas às frações imunodominantes, das quais, 102 funções foram relacionadas a 148 grupos proteicos em LaAg(s) (63% da fração) ao passo que 103 funções foram relacionadas a 132 grupos de proteínas em LnAg(s) (56% da fração). Ou seja, esse resultado é representativo de mais da metade das proteínas identificadas das frações imunodominantes antigênicas. Para 86 proteínas em LaAg(s) e 87 em LnAg(s), não foram encontradas funções moleculares anotadas. As funções mais expressivas, em números de proteínas foram representadas graficamente (figura 5.8).

As funções moleculares com maior número de proteínas estão relacionadas à síntese e degradação de proteínas. O LaAg(s) apresentou um maior número de proteínas com atividade ligase t-RNA, endopeptidase e metalo carboxi-peptidase. Os dois antígenos apresentaram igualmente ligantes de RNA. As demais funções foram mais relacionadas a proteínas de LnAg(s), especialmente a função de ligantes de ATP.

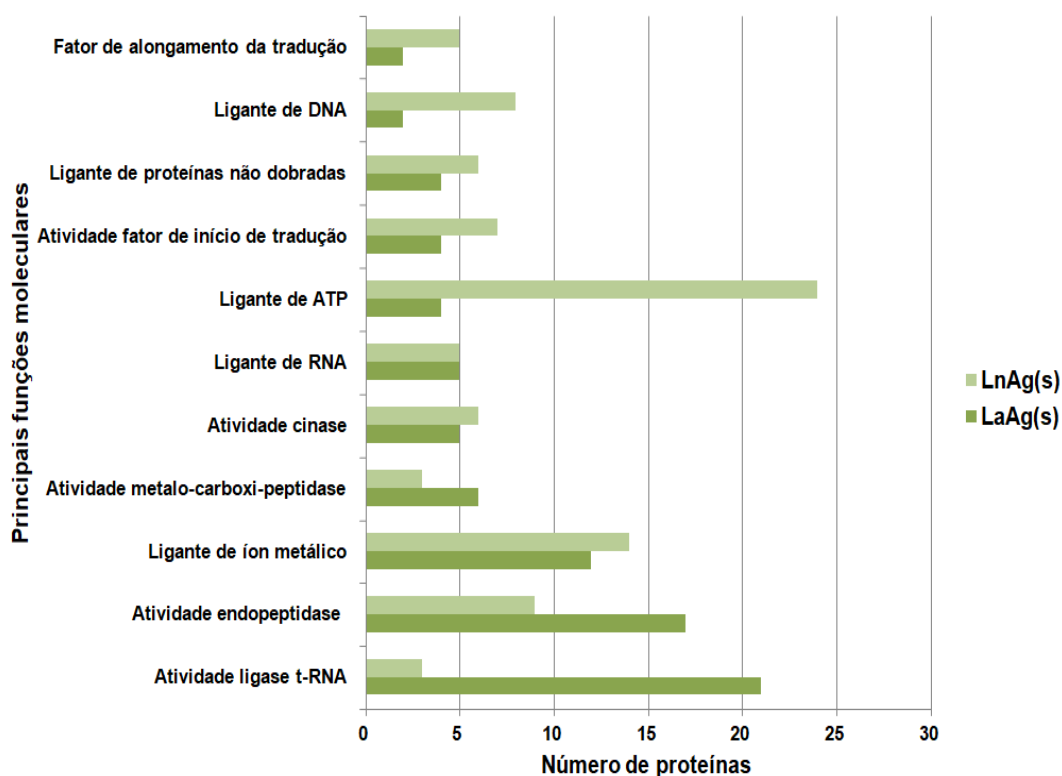


Figura 5.8: Funções moleculares mais expressivas, em números de proteínas, dentre as proteínas mais abundantes em LaAg(s) e em LnAg(s).

5.3. Análise de similaridade

Em primeiro lugar analisamos a similaridade de proteínas que escolhimos como “controle” por serem antígenos amplamente caracterizados como alvos vacinais. Essas proteínas apresentaram variados valores de identidade com proteínas humanas, sendo a HBsAg a que apresentou maior valor (alta similaridade: 93% identidade-ID). A proteína de circunsporozoíta de *P. falciparum* apresentou baixa similaridade (similaridade: 30% ID) ao passo que a proteína *diacylglycerol acyltransferase/mycolyltransferase* Ag85A de *M. bovis*, apresentou valor de similaridade dentro da faixa de sinal impreciso (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Similaridade de proteínas vacinais já caracterizadas com proteínas do homem (controles de predições)

Organismo	Acesso Uniprot	Descrição da proteína	Similaridade (% identidade - ID)

<i>Plasmodium</i>			
<i>falciparum</i>	Q7K740	<i>Circumsporozoite protein</i>	30
Vírus da Hepatite			
B	Q81158	<i>HBV Surface antigen (HBsAg)</i>	93*
<i>Mycobacterium</i>	P0C2T1		
<i>bovis</i>	(A85A_MYCBO)	<i>Ag85A</i>	<20

ID: Identidade

*Cobertura >50%

A análise de similaridade entre as proteínas das frações imunodominantes de LaAg(s) e de LnAg(s) e as proteínas humanas - *Homo sapiens* (taxid 9606), de cão - *Canis familiaris* (taxid 9615), e de hamster - *Mesocricetus auratus* (taxid 10036) é demonstrada pelos *heat maps* nas figuras 5.9A, 5.10A e 5.11A.

Esta análise revelou que apenas 40 proteínas em LaAg(s), 41 em LnAg(s) e 47 comuns a ambos os antígenos tinham baixa similaridade a proteínas de humanos ou apresentavam com sinal impreciso. O grupo das 47 proteínas comuns às duas frações foi selecionado para as análises seguintes de imunoinformática (fig.5.9B, 5.10B, 5.11B). O percentual de proteínas com similaridade baixa ou com sinal impreciso, na fração de LnAg(s) foi maior que na fração de LaAg(s), embora o número absoluto dessas proteínas seja menor que de LaAg(s), assim como o *imput* de proteínas analisadas, ndessa fração (Fig.5.9B e 5.10B).

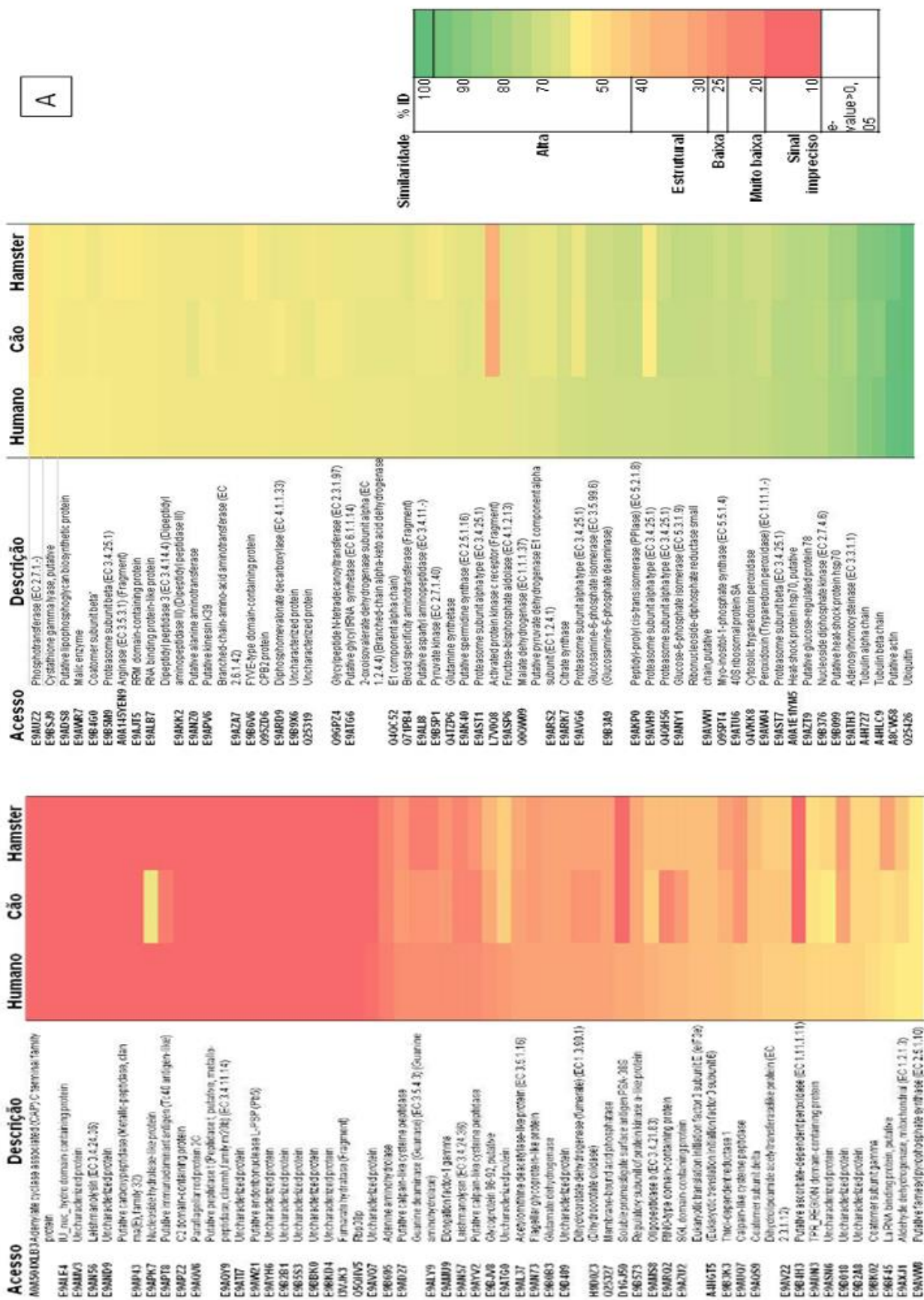


Figura 5.9A: Faixa de similaridade entre proteínas identificadas em LaAg(s) e proteínas de humanos, cão ou de hamster.

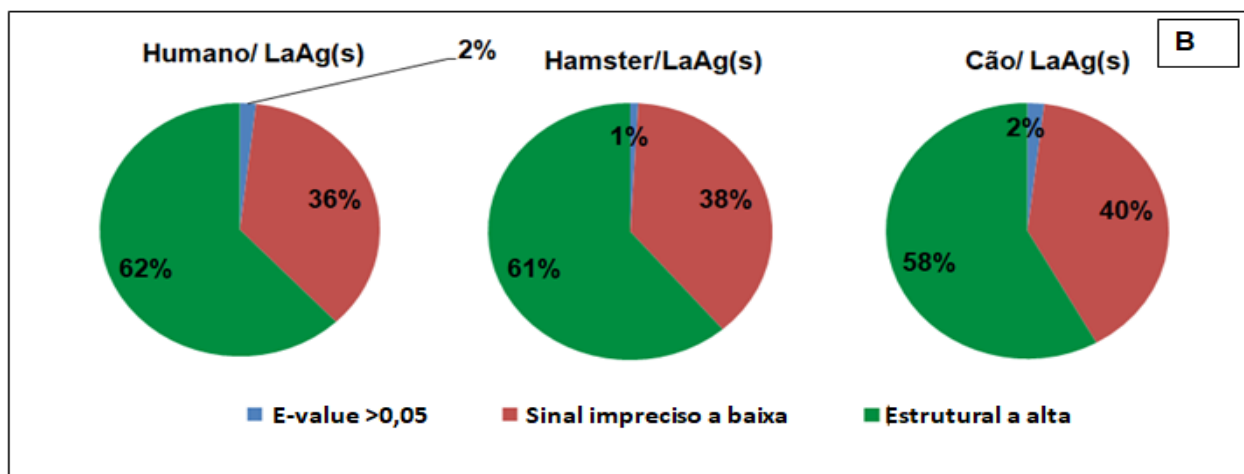


Figura 5.9B: Percentual de similaridade de proteínas identificadas apenas em LaAg(s) a proteínas de humanos, cão ou de hamster. *e-v*: *e-value*.

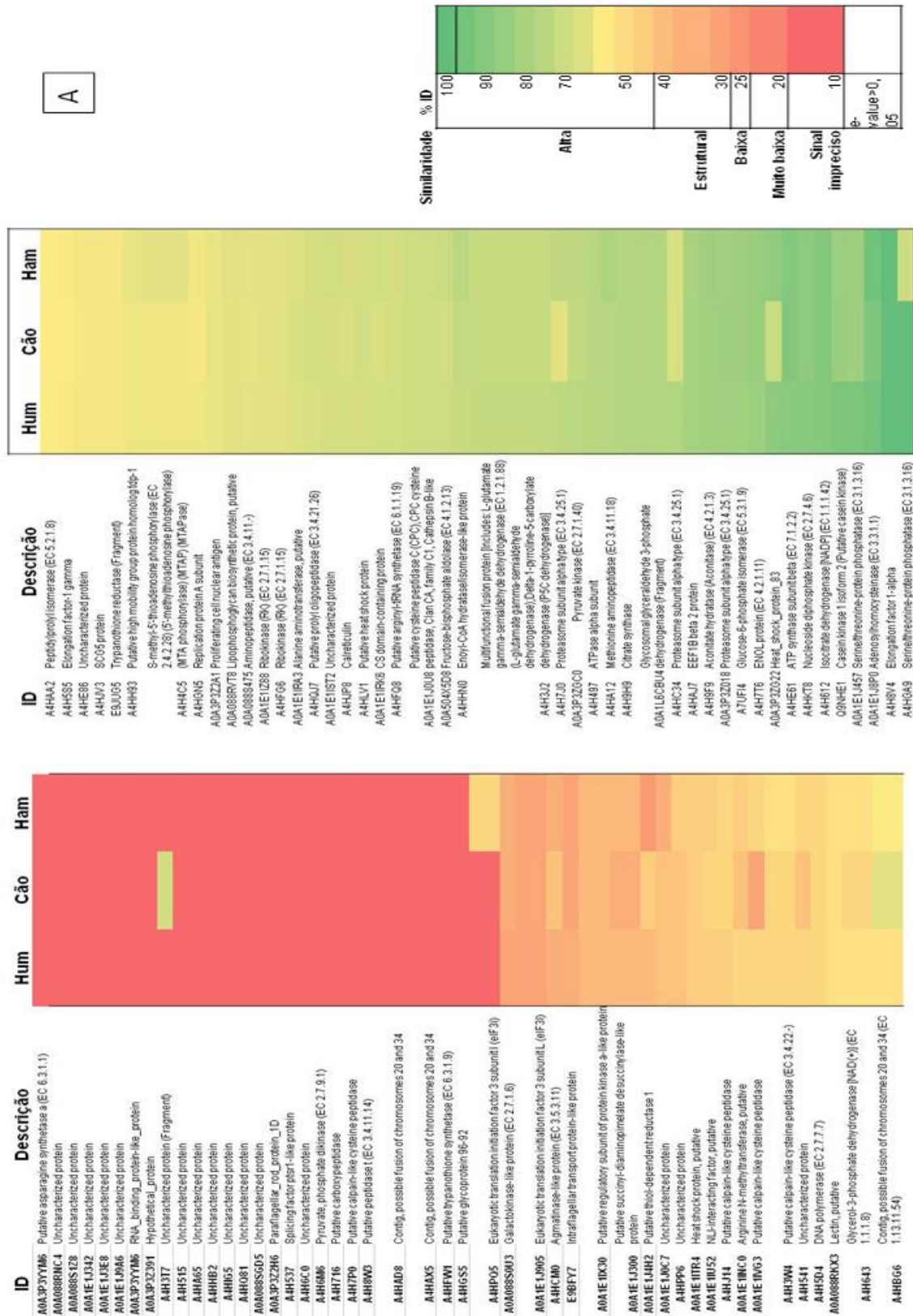


Figura 5.10A: Faixa de similaridade entre proteínas identificadas e, apenas em LnAg(s) e proteínas de humanos, cão ou de hamster.

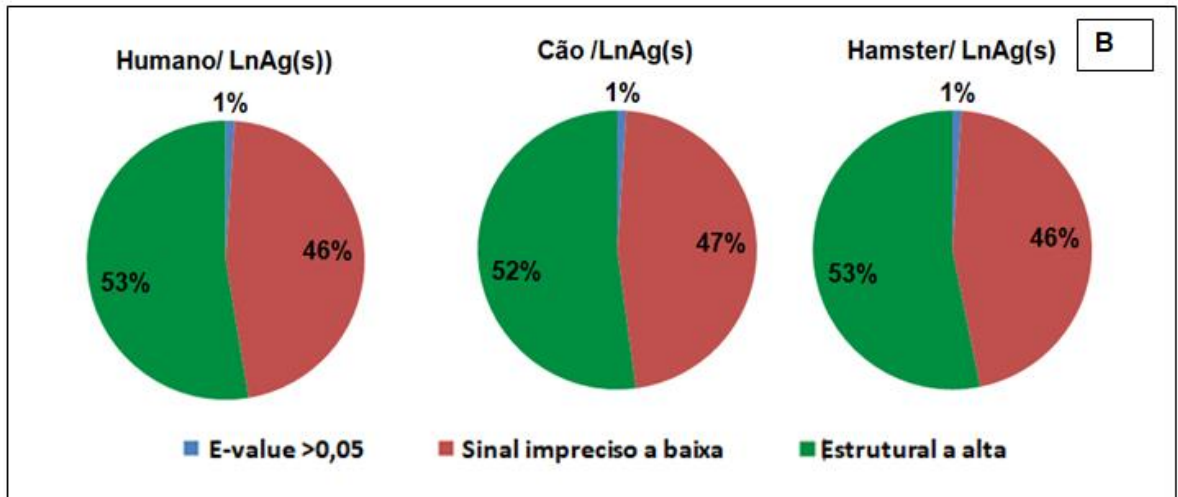


Figura 5.10.B: Percentual de similaridade de proteínas quantificadas apenas em LnAg(s) às proteínas humanas, de cão ou de hamster.

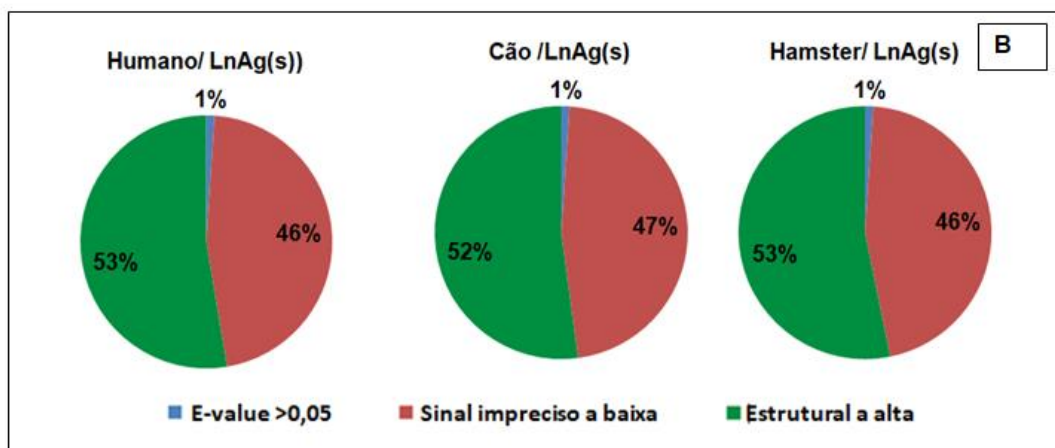


Figura 5.11.B: Percentual de similaridade de proteínas identificadas apenas em LaAg(s) e em LnAg(s) às proteínas de humanos, de cão ou de hamster. e-v: e-value.

5.4 Análise de imunoinformática das frações imunodominantes de LaAg(s) e LnAg(s)

5.4.1. Predição de epítomos na fração imunodominante de LaAg(s) e LnAg(s) reconhecidos por linfócitos B

Essa análise teve por finalidade a identificação de proteínas com mais epítomos de alta afinidade a receptores de células B. Para tal, foram consideradas as proteínas que apresentaram similaridade baixa ou com sinal impreciso a proteínas humanas.

Além disso, proteínas caracterizadas como alvos vacinais de outros organismos, também foram analisadas pelos mesmos métodos e mesmos parâmetros, como controles de análises para este estudo, como descrito anteriormente. Todas as proteínas apresentaram epítomos reconhecidos por células B, preditos em todos os programas.

Os resultados da predição de epítomos reconhecidos por linfócitos B nas proteínas identificadas em LaAg(s) ou em LnAg(s), ou em ambas as frações encontram-se no anexo 1. Como esperado, grande parte das proteínas analisadas apresentaram epítomos reconhecidos por células B, preditos por quase todos os

programas. De forma estridente, foram considerados para alvos vacinais apenas as proteínas que apresentaram predições em pelo menos 4 dos 6 programas usados.

Das 40 proteínas de LaAg(s), 28 apresentaram predições de epítomos reconhecidos por células B em pelo menos 5 preditores: ou seja, em mais preditores que o estabelecido para esse estudo (4 de 6 preditores). Os resultados das proteínas controles confirmam os achados com essas proteínas (Figura 5.12).

Das 41 proteínas de LnAg(s), somente 7 apresentaram predições de epítomos reconhecidos por células B em pelo menos 4 de 6 preditores (Figura 5.13). A maior parte dessas proteínas apresentou predições apenas em 3 preditores. Essas, ainda não tiveram sua estrutura tridimensional modelada e por essa razão, não foram analisadas pelos preditores de epítomos conformacionais.

Das 47 proteínas comuns às frações LaAg(s) e LnAg(s), 30 apresentaram resultados de acordo com o parâmetro estabelecido nesta análise (Figura 5.14).

A proteína "*Putative calpain-like cysteine peptidase*" (ID Uniprot E9AYV2) foi a que apresentou maior número de potenciais epítomos lineares preditos, com 574 desses epítomos, pelo programa ABC Pred. Essa proteína também apresentou maior predição de epítomos conformacionais reconhecidos por células B. Depois dessa, a "*WGS CADB00000000 data, contig 50 (Fragment)*" e a "*Uncharacterized protein*" (ID Uniprot A4H8U7) são as proteínas comuns a LaAg(s) e LnAg(s) que mais apresentaram epítomos conformacionais.

As proteínas analisadas, da fração imunodominante de LnAg(s) apresentaram mais epítomos preditos, reconhecidos por linfócitos B, mesmo tendo um número menor de proteínas analisadas, em relação ao grupo de proteínas analisadas de LaAg(s).

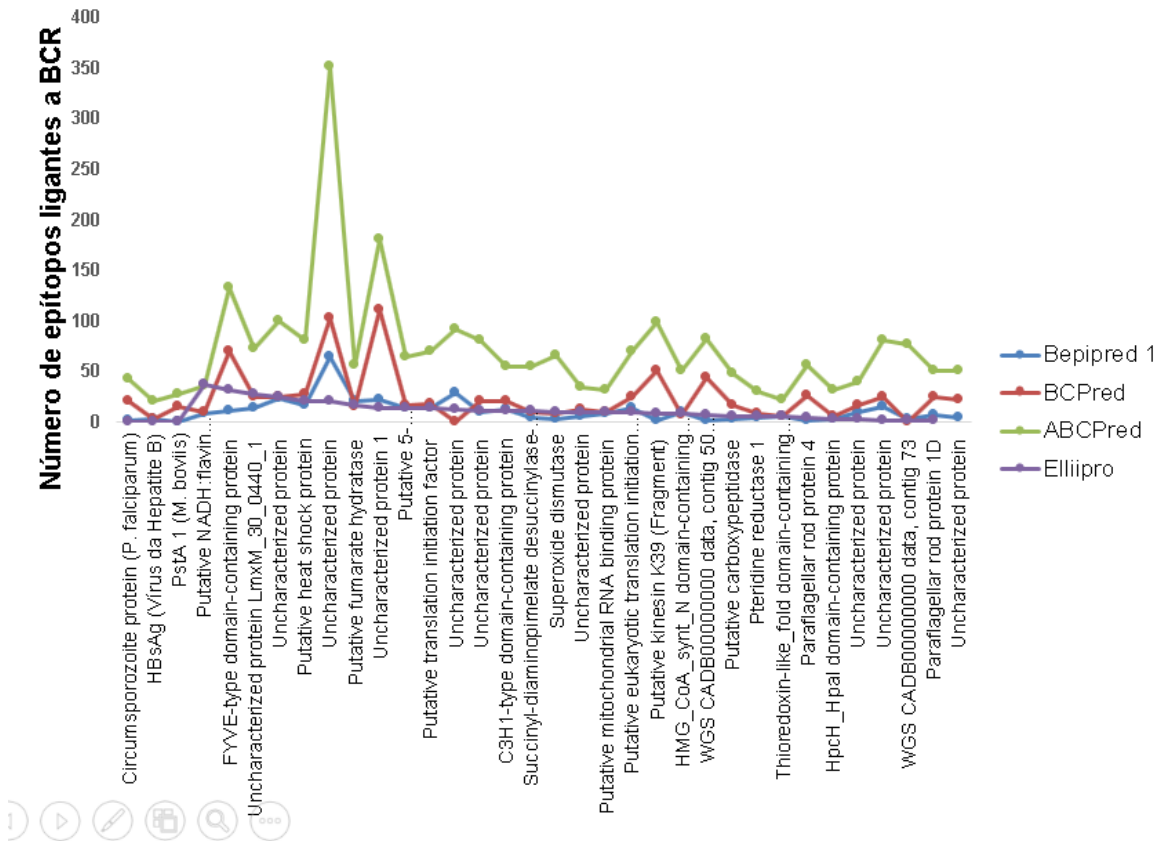


Figura 5.14: Predição de epítomos lineares de linfócitos B, de proteínas de proteínas identificadas em LaAg(s) e em LnAg(s)

5.4.2. Predição de epítomos apresentados por HLA

5.4.2.1. Predição de epítomos apresentados por HLA II em proteínas de LaAg(s) e de LnAg(s)

Para essa análise foram utilizados dois programas IEDB e NetMHCIIpan. Em uma primeira abordagem comparamos os 2 programas utilizados para predição de epítomos apresentados por HLA de classe II para identificar o número total de epítomos em cada fração imunodominante. Essa análise foi feita para cada grupo de proteínas com similaridade igual ou menor a 30% (ID) a proteínas humanas de cada fração imunodominante, como feito para a predição de epítomos reconhecidos por linfócitos B, anteriormente. Foram analisados os mesmos conjuntos de proteínas, sendo 40 proteínas quantificadas apenas em LaAg(s), 41 apenas em LnAg(s) e 47 proteínas comuns aos dois grupos. Os resultados dessa predição encontram-se na tabela do anexo 2.

Para cada proteína do antígeno LaAg(s) analisada foi determinado o total de epítomos reconhecidos por HLA de classe II, e o total de alelos envolvidos nesse reconhecimento (Anexo 2).

A análise das proteínas consideradas como controles mostrou que a proteína *Circumsporozoite protein* de *P. falciparum*, apresentou menos que 50 potenciais epítomos, preditos pelos dois programas usados. A proteína *diacylglycerol acyltransferase/mycolyltransferase Ag85A*, do antígeno vacinal *Mycobacterium bovis*, apresentou menor número de epítomos a HLA II, preditos pelas ferramentas NetMHCIIpan e IEDB. Na análise por esse programa, a proteína vacinal *HBsAg do vírus da Hepatite B* apresentou maior número de epítomos.

Em relação ao reconhecimento de diferentes alelos reconhecidos por HLA II, todas as proteínas controles apresentaram epítomos ligantes a mais que 10, dos 23 alelos analisados, por pelo menos um dos dois programas. A proteínas *Ag85A (Mycobacterium bovis)* apresentou epítomos ligantes a 10 ou mais alelos de HLA II, pelos dois programas.

As proteínas selecionadas por essa análise apresentaram predições com maiores números de ligações epítomo-HLA II preditas e com número de alelos de HLA II reconhecidos, maiores que 10, pelos dois programas.

Das proteínas quantificadas apenas na fração LaAg(s), 13 apresentaram predição de mais que 100 epítomos reconhecidos por 10 alelos de HLA classe II, por pelo menos 1 preditor. Todas essas proteínas apresentaram maior número de epítomos que as proteínas controle, de acordo com a análise no programa NetpanMHCII.

A proteína *Putative immunodominant antigen (Tc40 antigen-like)* foi a potencialmente mais imunodominante nesse grupo de proteínas, com mais epítomos preditos e também a mais promíscua, em relação a ligação a HLA de classe II. A predição da promiscuidade dessas 13 proteínas encontra-se na figura 5.15. As proteínas “*Putative immunodominant antigen (Tc40 antigen-like)*” e duas “*Uncharacterized protein*” (ID Uniprot E9B5S3 e E9AMV3), apresentaram predições de ligações a todos os alelos de HLA analisados. Nesse aspecto essas proteínas equipararam-se à proteína vacinal controle “*Ag85A*” de *M. bovis*.

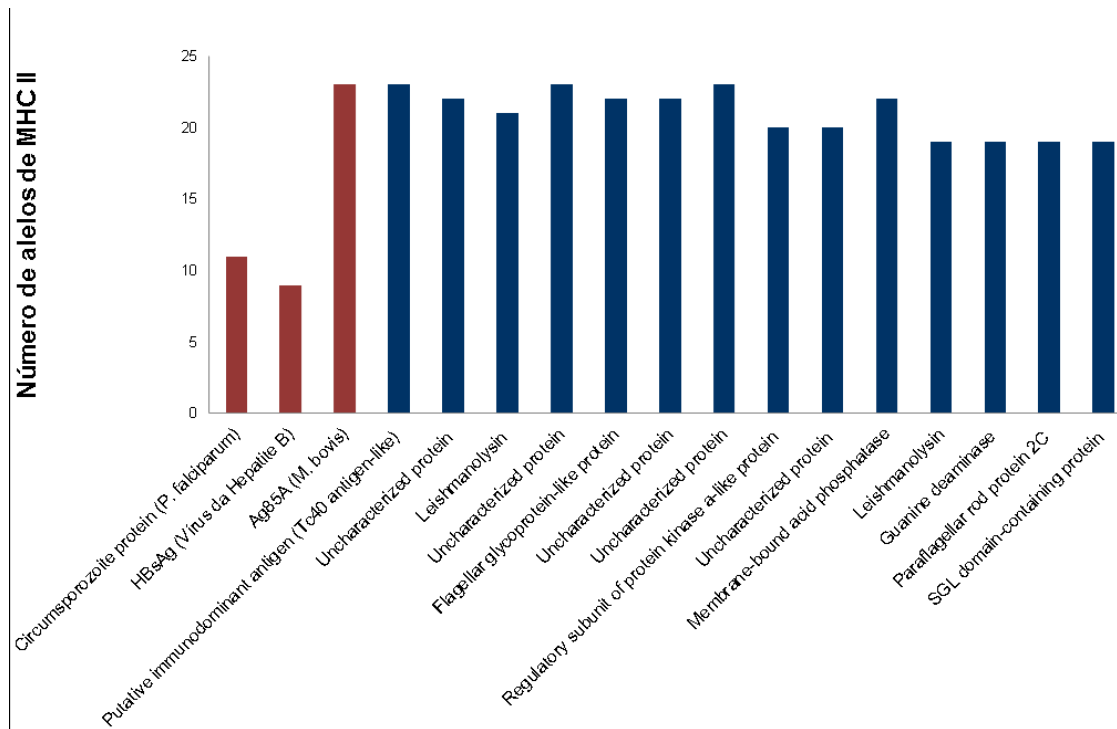


Figura 5.15. Proteínas com mais epítomos promíscuos de LaAg(s), em relação à ligação a HLA II, com base no número de alelos de HLA.

Na verificação da distribuição de epítomos por alelo de HLA II, observou-se que o par de alelos HLA-DQA10501-DQB1030 teve maior predição de epítomos ligantes em todas as 13 proteínas mais imunodominantes dessa análise. Das proteínas “controles”, a Ag85A de *M. bovis* apresentou epítomos preditos ligantes a esses alelos. Das proteínas de LaAg(s) analisadas, a proteína *Putative immunodominant antigen (Tc40 antigen-like)* foi a que apresentou mais potenciais epítomos ligantes ao par de alelos supracitado, em relação às proteínas vacinais controles e às outras proteínas demonstradas. A representação gráfica do número de epítomos ligantes a cada alelo de HLA II, por proteína, encontra-se na figura 5.16

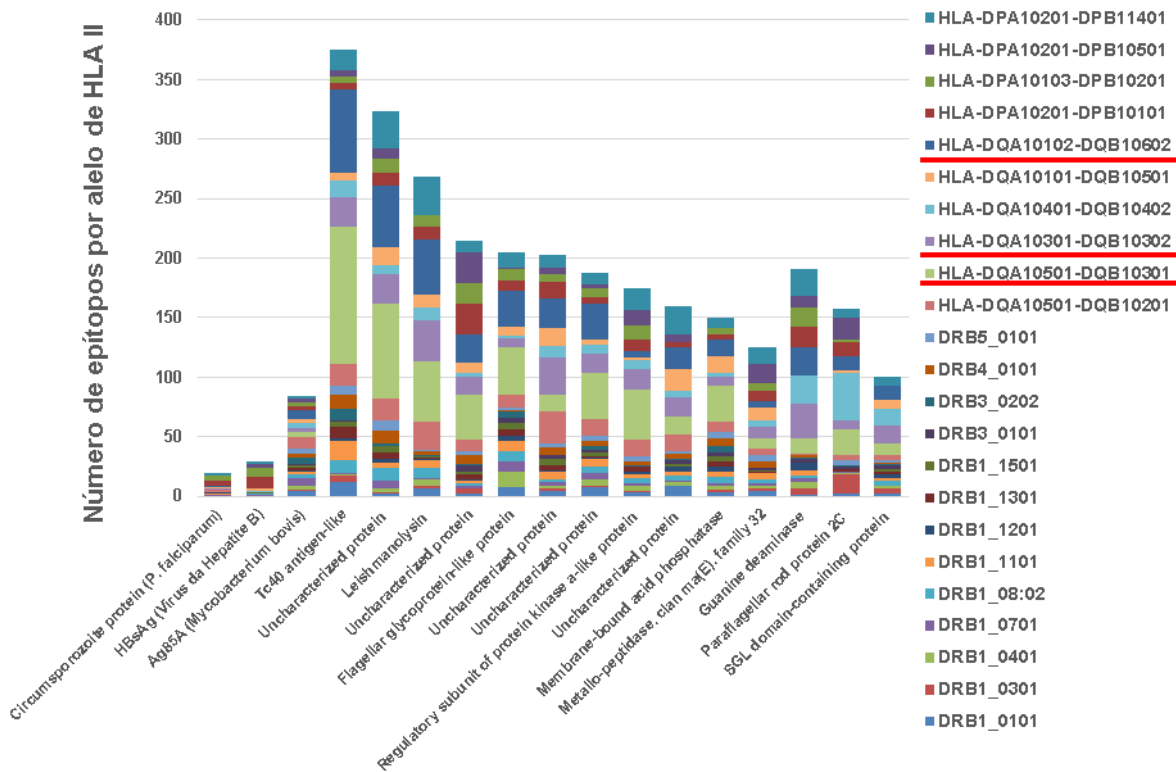


Figura 5.16: Proteínas com mais epítomos promíscuos ligantes a antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II, identificadas apenas na fração imunodominante de LaAg(s). Eixo x: proteínas. Eixo Y: Número de epítomos preditos por alelo de HLA II.

Do grupo de 41 proteínas analisadas de LnAg(s), 26 apresentaram-se mais promíscuas em relação à ligação com alelos de HLA II, com um elevado número de epítomos preditos. Apenas três proteínas apresentaram menor número de epítomos, com ligações restritas a menos de 10 alelos de HLA, pelos dois programas. Somente pelo programa IEDB, todas as proteínas desse grupo apresentaram potencial ligação a menos que 10 alelos de HLA II. Nesse caso, foram consideradas como potencialmente mais imunogênicas as proteínas que apresentaram mais que 10 epítomos de HLA II de acordo com o preditor NetMHCII. Todas as proteínas tiveram número de potenciais epítomos maior que os das proteínas controle (Anexo II).

A predição da promiscuidade das 26 proteínas potencialmente mais imunodominantes, encontra-se na figura 5.17. Das proteínas apresentadas, 2 proteínas, à semelhança da proteína vacinal controle *Ag85A* de *M. bovis*, apresentaram predição de afinidade a todos os 23 alelos da análise. São elas a

Pyruvate phosphate dikinase e a Putative regulatory subunit of protein kinase a-like protein.

A distribuição de epítomos ligantes aos alelos específicos, por proteína de LnAg(s), está demonstrada na figura 5.18.

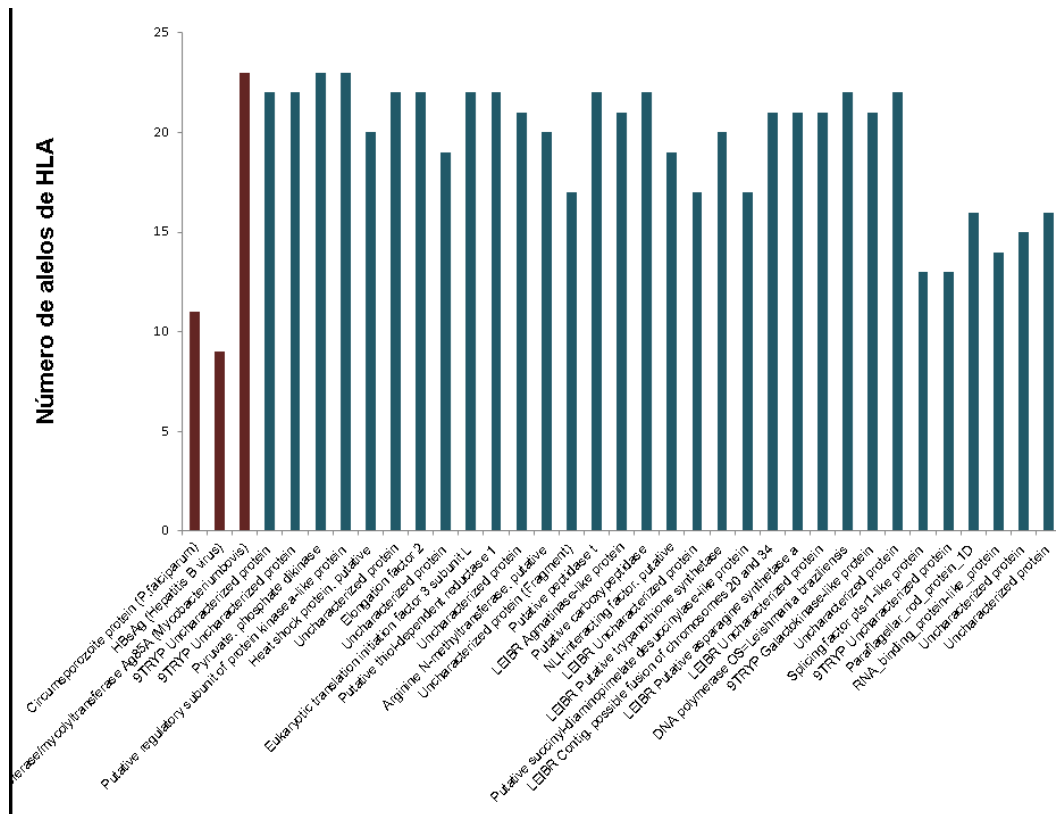


Figura 5.17. Proteínas com mais epítomos promíscuos em relação à ligação a a HLA de classe II, identificadas apenas em LnAg(s).

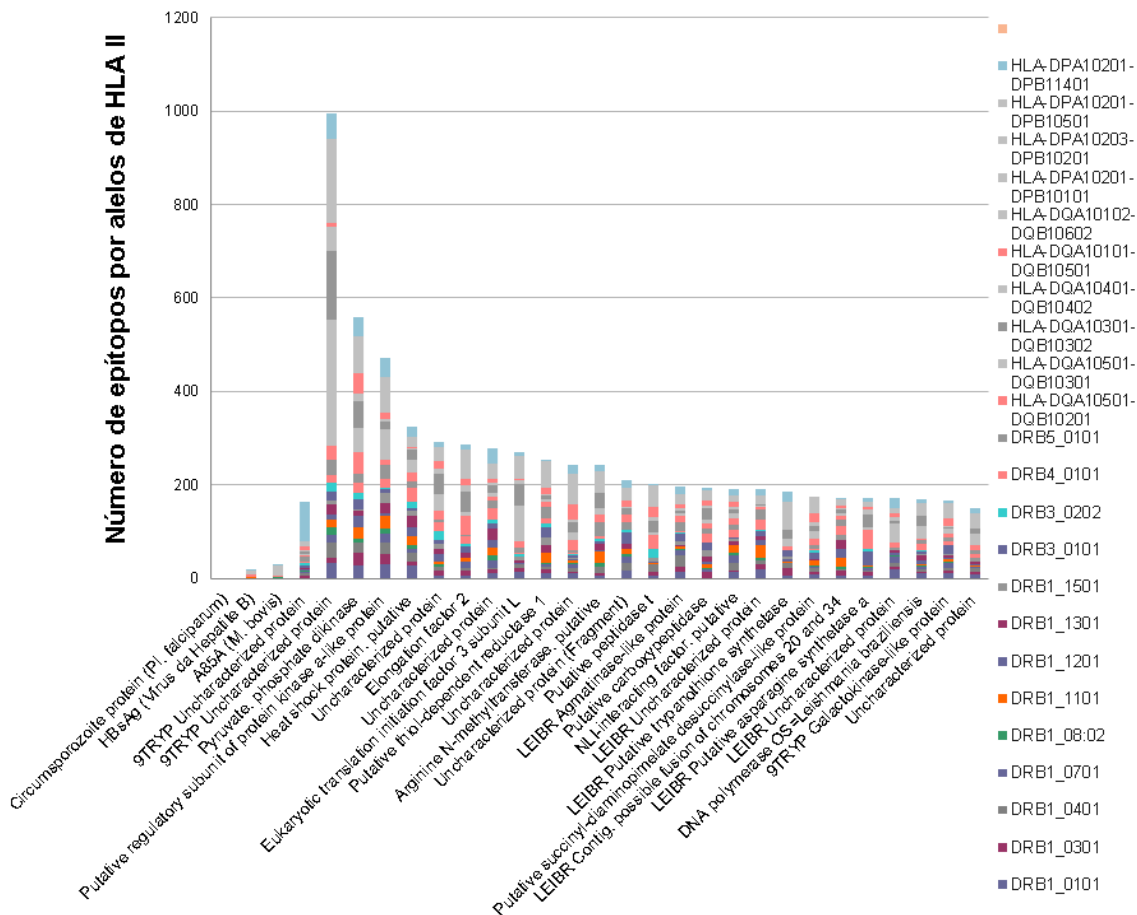


Figura 5.18. Proteínas com mais epítomos promíscuos identificadas apenas na fração imunodominante de LnAg(s) a antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II. Eixo x: proteínas. Eixo Y: Número de epítomos preditos por alelo de HLA II.

Foram analisadas as 47 proteínas quantificadas em comum em ambas as frações imunodominantes e selecionadas conforme descrito anteriormente. O total de epítomos de HLA II, por proteína, além do total de alelos de HLA reconhecidos por cada proteína também encontram-se no anexo II.

Do grupo de proteínas que são comuns às frações LaAg(s) e LnAg(s), a maior parte apresentou-se promíscua em relação à ligação a epítomos HLA II, com um elevado número de epítomos preditos. Um total de 20 proteínas apresentou maiores números de epítomos de HLA II, além de reconhecerem mais que 10 alelos de HLA II pelos dois programas. Todas essas 20 proteínas apresentaram número de epítomos igual ou maior que os das proteínas controle. A predição da promiscuidade em relação à ligação a HLA, dessas 20 proteínas potencialmente mais imunodominantes, encontra-se na figura 5.19. Das proteínas apresentadas, 4

proteínas, à semelhança da proteína vacinal controle “Ag85A”, de *M. bovis*, apresentaram predição de afinidade a todos os 23 alelos da análise.

Embora as proteínas analisadas sejam originadas de frações imunodominantes de *Leishmania*, o potencial de ligação a HLA II não foi observado para a totalidade das mesmas, não havendo predição dessas ligações para algumas das proteínas analisadas.

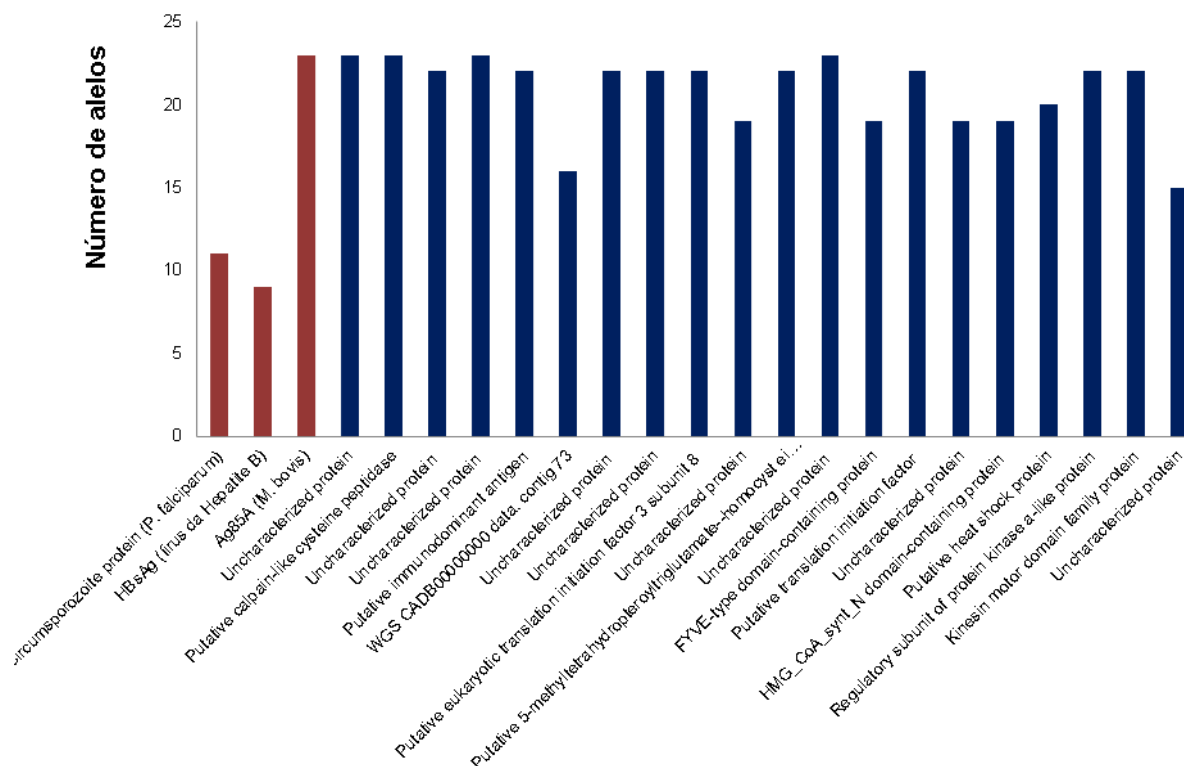


Figura 5.19: Proteínas com mais epítomos promíscuos de proteínas identificadas em LaAg(s) e LnAg(s), com base no número de alelos de HLA II.

A distribuição de epítomos por alelo de HLA II, desse grupo de proteínas encontra-se representada graficamente na figura 5.20. Considerando-se essas 20 proteínas, foram preditos mais epítomos para o par de alelos HLA-DQA10301-DQB10302. Todas as proteínas controles apresentaram epítomos preditos, ligantes a esse par de alelos. Dentre essas proteínas, a HBsAg (vírus da hepatite B) foi a que apresentou maior número de epítomos preditos, nesse caso. Das proteínas comuns à LaAg(s) e à LnAg(s) analisadas, a *Uncharacterized protein* (ID Uniprot

E9ATV9) foi a que apresentou mais potenciais epítomos ligantes ao par de alelos supracitado, em relação às proteínas controles e a outras proteínas analisadas.

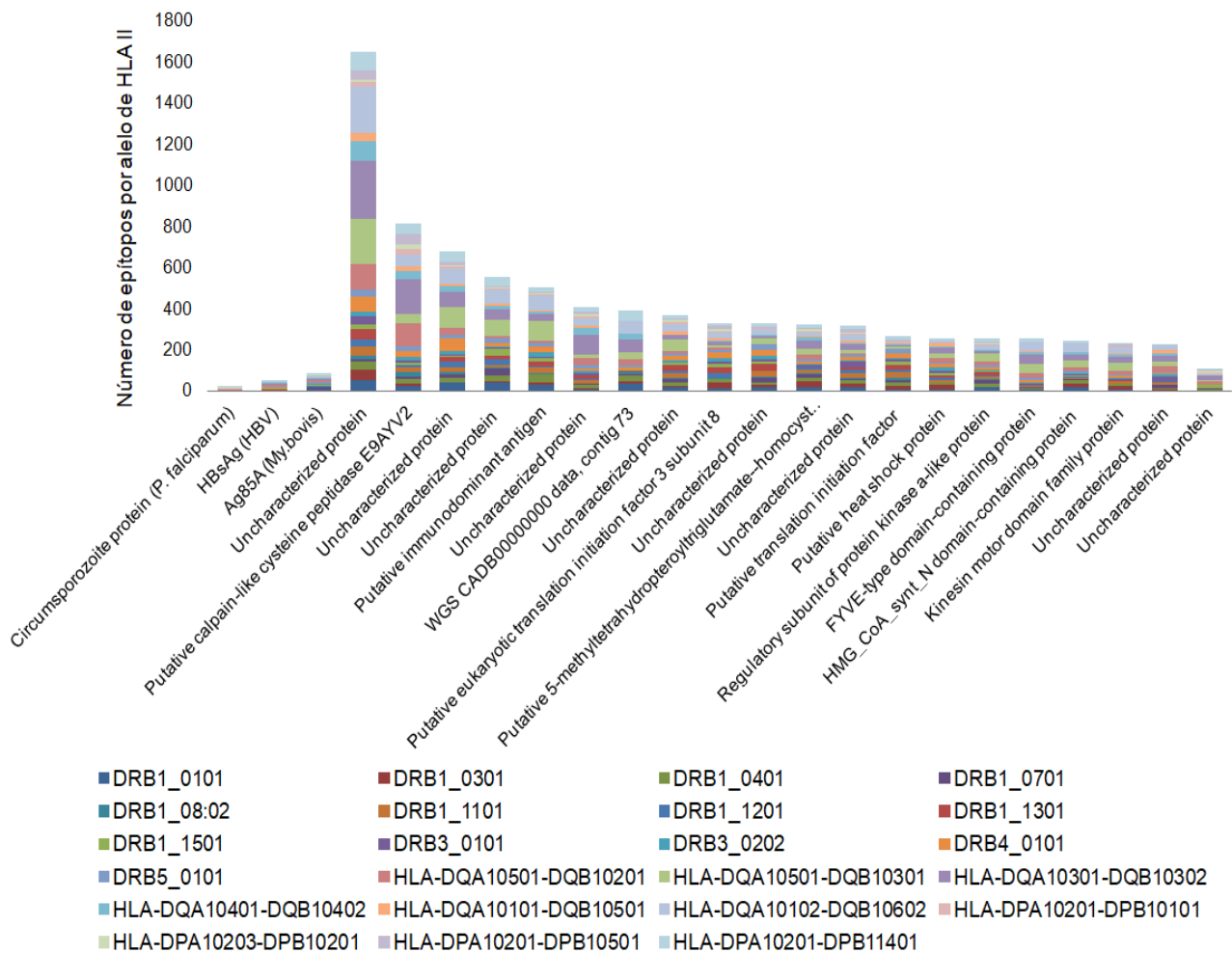


Figura 5.20: Proteínas com epítomos mais promíscuos identificadas em comum nas frações imunodominantes de LaAg(s) e de LnAg(s) a antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II. Eixo X: proteínas. Eixo Y: Número de epítomos preditos por alelo de HLA II.

5.4.2.2. Predição de epítomos apresentados por HLA de classe I

A análise de epítomos de HLA I foi feita da mesma forma que a análise anterior. Os resultados finais dessa análise encontram-se no anexo III. Foram selecionadas, de cada grupo de proteínas analisado (proteínas identificadas apenas em LaAg(s), proteínas identificadas apenas em LnAg(s) e proteínas comuns às duas frações),

dez proteínas com maiores números de ligações epítipo-HLA I preditas e com número de alelos de HLA I reconhecidos, maiores que 10, pelos dois programas.

A predição de epítomos foi feita para 27 alelos de HLA de classe I, dos mais predominantes na população humana. A proteína *Circumsporozoite*, teve a menor predição a ligações a diferentes HLA de classe I, dada pelos dois programas utilizados para essa análise – NetCTLpan e IEDB.

Em relação às proteínas da fração LaAg(s) analisadas, todas apresentaram potencial de ligações à maior parte dos alelos de HLA I, mostrando-se promíscuas em relação a essa ligação. Das 40 proteínas analisadas, 22 proteínas apresentaram maior número de epítomos que a proteína vacinal controle *HBsAg*. A figura 5.21 demonstra 10 dessas proteínas.

A distribuição de epítomos por alelo de HLA I, para cada uma das 10 proteínas mais imunodominantes dessa análise, está representada na figura 5.22. Essas proteínas tiveram uma maior predição de epítomos ao alelo HLA-B*08:01, seguido pelos alelos HLA-A*30:01 e HLA-B*40:01. Em relação ao alelo HLA-B*08:01, apenas a proteína controle vacinal *Ag85A*, de *M. bovis*, não apresentou epítomos preditos para ligação ao mesmo. Os outros controles e as 10 proteínas selecionadas, apresentaram esses potenciais epítomos.

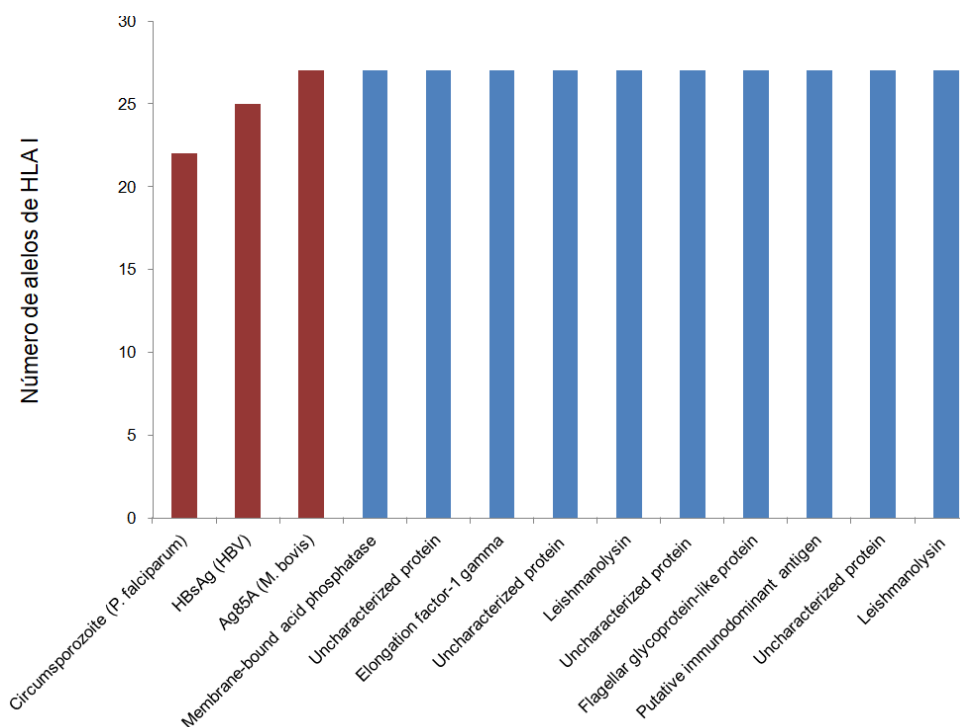


Figura 5.21: Dez proteínas de LaAg(s) com mais epítomos promíscuos em relação a HLA de classe I, com base no número de alelos reconhecidos.

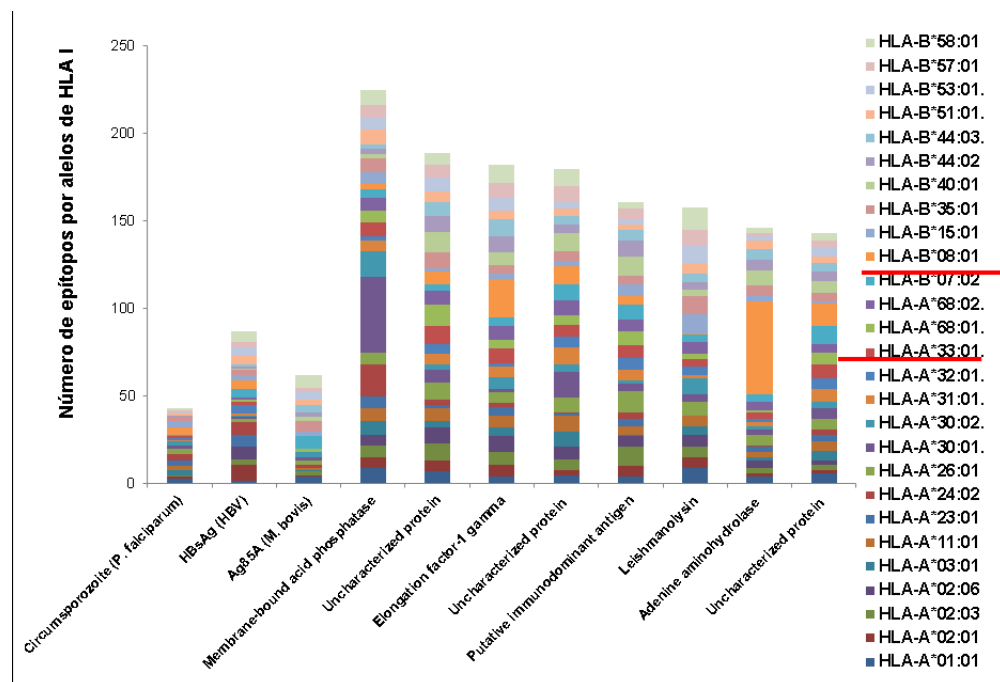


Figura 5.22: Frequência de epítomos por alelos de HLA I, de 10 proteínas com mais epítomos promíscuos, identificadas apenas em LaAg(s) e de proteínas controles, com base no número de alelos de HLA I reconhecidos.

As proteínas identificadas apenas em LnAg(s) também foram analisadas quanto à predição de epítomos de HLA I. Os dados gerados dessa análise estão descritos no anexo 3.

De forma diferente do que ocorreu com a análise de epítomos de HLA II, os dois preditores apresentaram predições equivalentes entre si, para esse grupo de proteínas. Das 41 proteínas analisadas, 34 apresentaram mais epítomos para HLA I que a proteína controle HBsAg. A *9TRYP Uncharacterized protein* apresentou maior número de epítomos ligantes a HLA-I, nesse grupo.

As dez proteínas potencialmente mais imunodominantes nessa análise apresentaram epítomos preditos ligantes a 26 ou 27 desses alelos de HLA-I (Figura 5.23). Desses alelos, o que mais apresentou epítomos ligantes, dentre as 10 proteínas mencionadas, foi o HLA-A*33:01 e o que teve menor predição foi o HLA-A*24:02 (Figura 5.24). A *9TRYP Uncharacterized protein* (ID Uniprot A0A088RNC4), de maior tamanho dentre as proteínas desse grupo, apresentou maior número de epítomos preditos por alelo de HLA I.

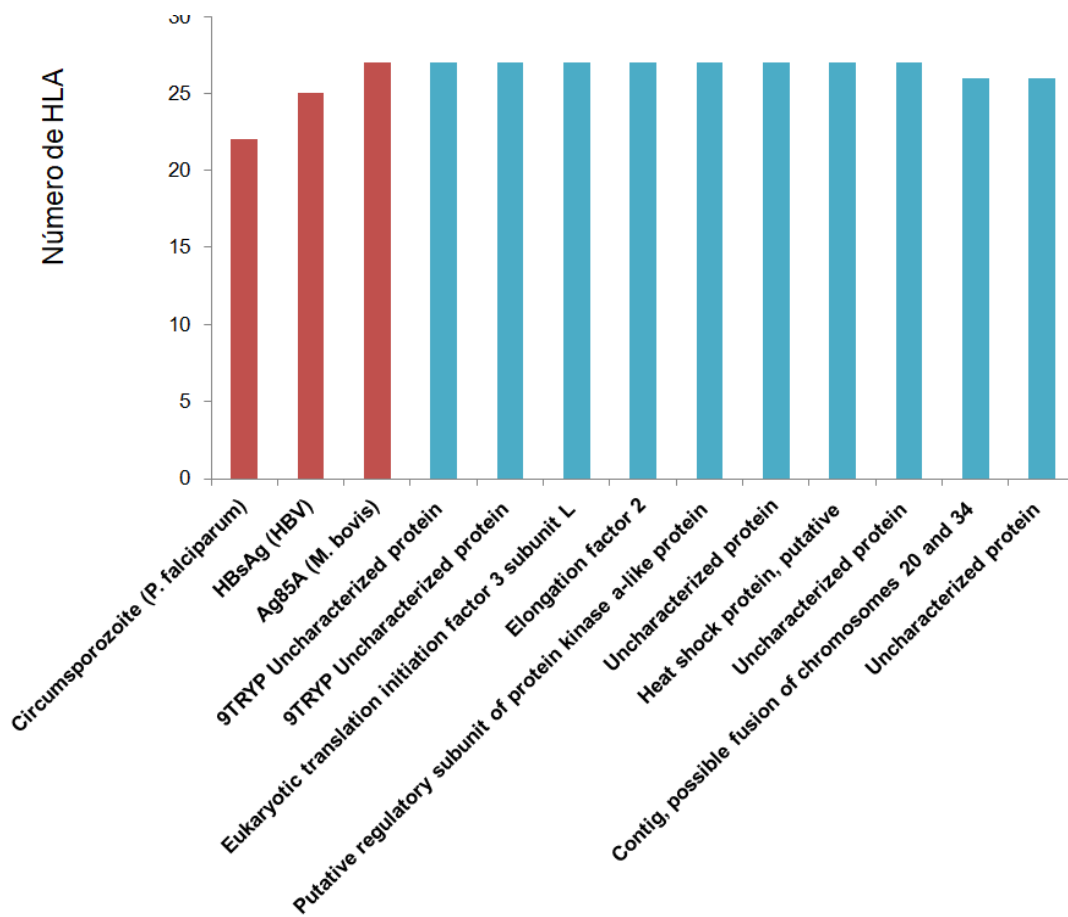


Figura 5.23: Dez proteínas com mais epítomos promíscuos, identificadas apenas em LnAg(s), com base no número de alelos reconhecidos de HLA de classe I.

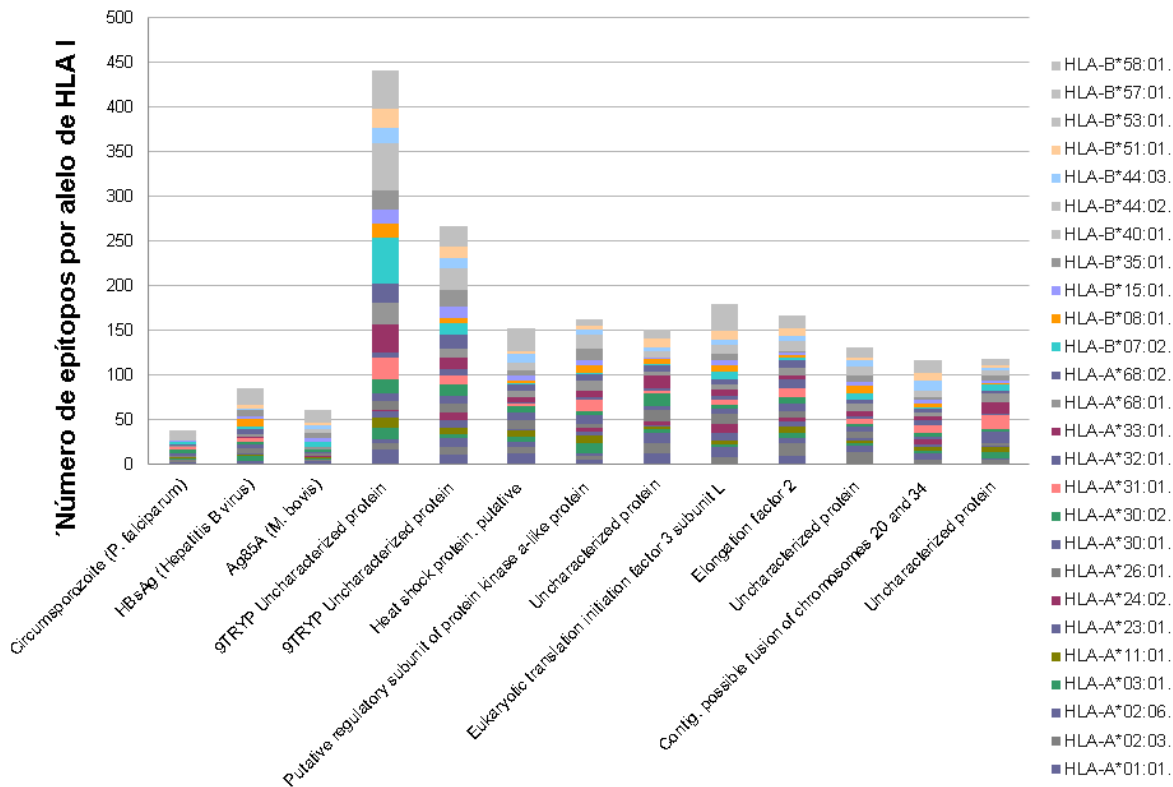


Figura 5.24: Frequência de epítomos por alelos de HLA I, das 10 proteínas com mais epítomos promíscuos, identificadas apenas em LnAg(s) e de proteínas controles, com base no número de alelos de HLA I reconhecidos. Eixo x: proteínas. Eixo Y: Número de epítomos preditos por alelo de HLA I..

Em relação à predição de epítomos de HLA-I, das proteínas comuns às frações LaAg(s) e LnAg(s), 31 das 47 proteínas analisadas apresentaram epítomos preditos ligantes a HLA I em maior número que a proteína vacinal controle *HBsAg*. Uma *Uncharacterized protein* (ID Uniprot E9ATV9) apresentou maior número de predições de epítomos ligantes aos alelos de MHC I considerados nessa análise (Anexo III).

As demais proteínas apresentaram valores que variaram de 86, próximo ao da proteína controle *HBsAg*, até 0.

Das 10 proteínas potencialmente mais imunodominantes, determinadas por essa análise, todas as proteínas apresentaram maior número de epítomos de HLA I que as proteínas controles. Essas proteínas também apresentaram predição de epítomos ligantes a todos os alelos de HLA I apreciados nessa análise (Figuras 5.25 e 5.26). A predição de epítomos para cada um desses alelos demonstrou que duas *Uncharacterized proteins* (ID Uniprot E9ATV9 e Q4QBL4) apresentaram mais

epítomos por alelos. O alelo de HLA I mais reconhecido por todas essas proteínas é o HLA-A*68:02 (Figura 5.24).

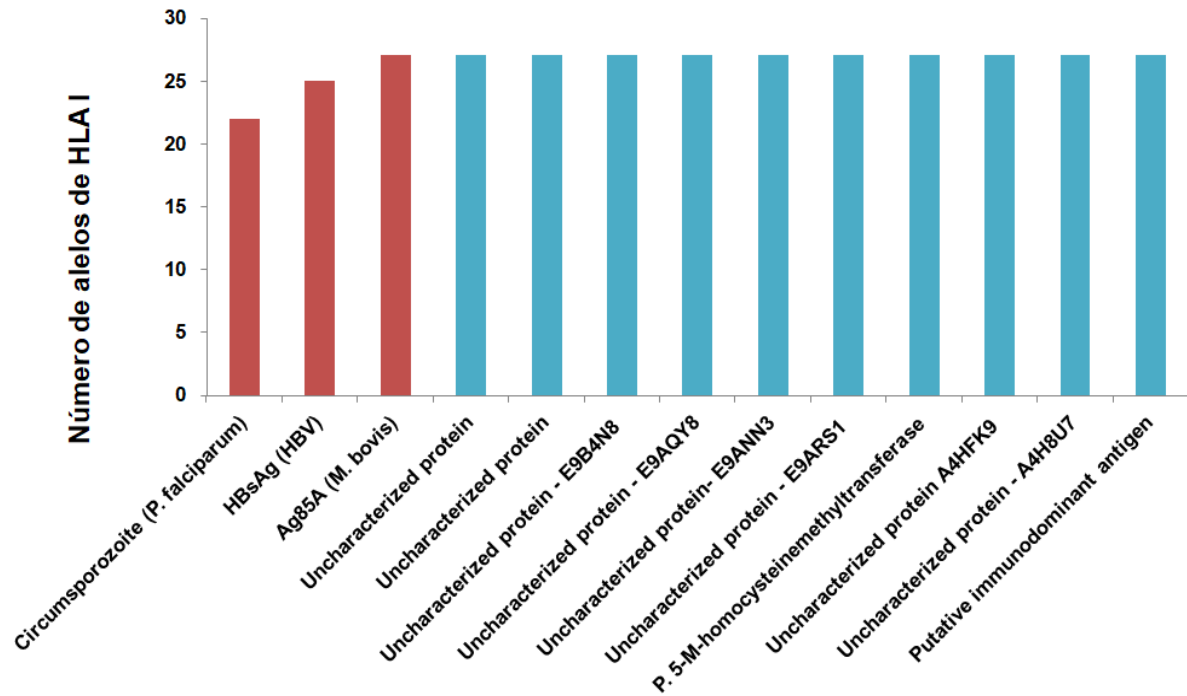


Figura 5.25: Dez proteínas com mais epítomos promíscuos, quantificadas comumente em LAg(s) e em LnAg(s). Análise baseada no número de alelos reconhecidos de HLA de classe I.

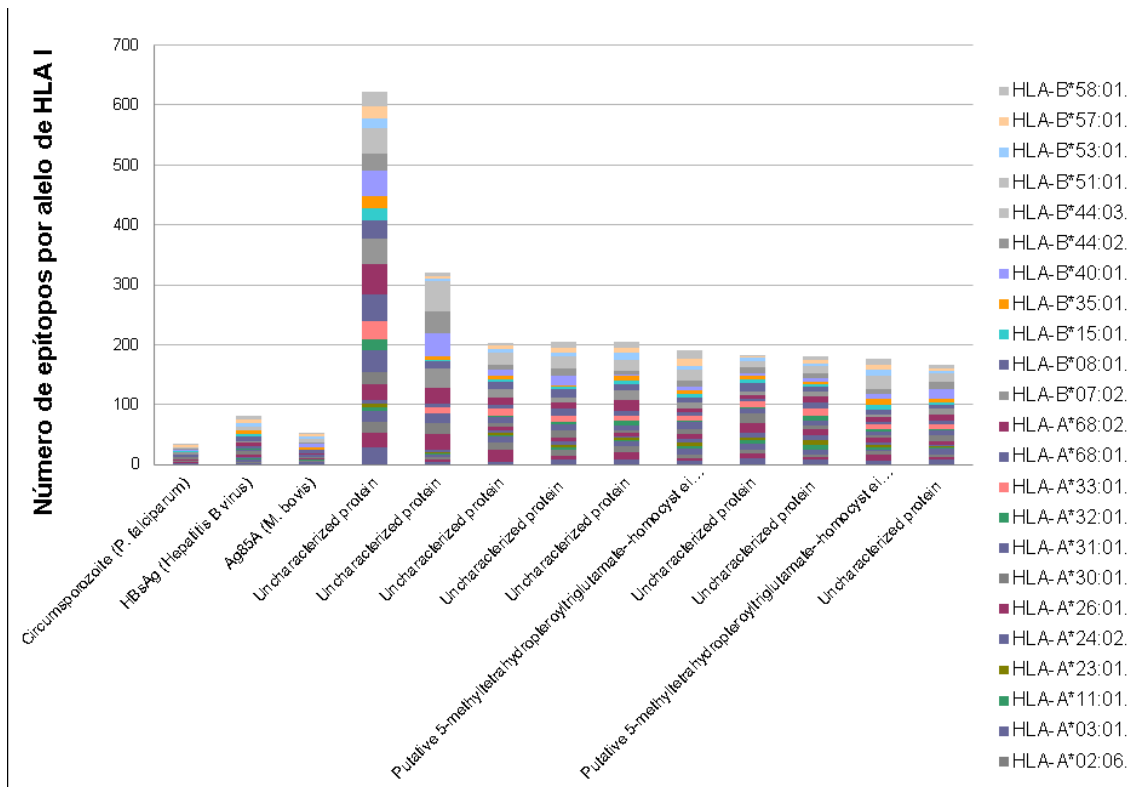


Figura 5.26: Frequência de epítomos por alelos, das 10 proteínas com mais epítomos promíscuos, quantificadas tanto em LaAg(s) como em LnAg(s) Eixo x: proteínas. Eixo Y: Número de epítomos preditos por alelo de HLA I.

A figura 5.27 resume as análises de predição de epítomos apresentados por HLA de classes II e I, por fração imunodominante. Houve diferença em relação a número total de epítomos ligados aos alelos de HLA II, entre as frações. A fração LnAg apresentou menor número de epítomos de HLA de classe I, que de classe II. Já a fração de LaAg(s) apresentou maior número de epítomos preditos para HLA I.

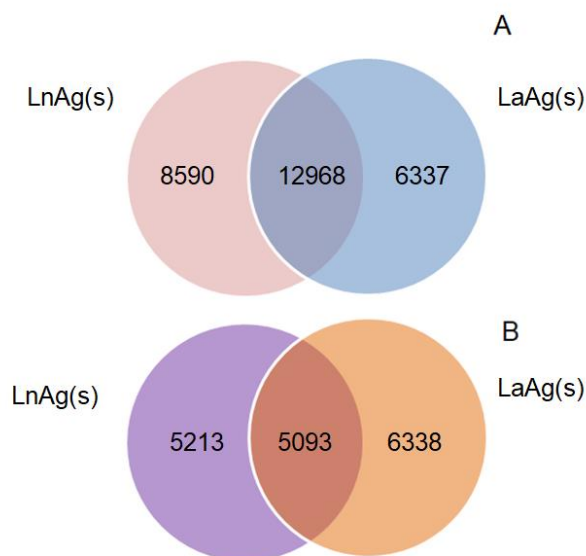


Figura 5.27: Número de epítomos ligantes de HLA II (Fig.A) e de HLA I (Fig. B) de LnAg(s) e de LaAg(s). A quantificação do número de epítomos em cada fração se deu pelo somatório dos epítomos preditos, respectivamente, pelos métodos NetMHCIIpan e NetCTLpan, de cada proteína analisada. Demonstrados, na figura, número de epítomos preditos nas proteínas identificadas apenas em LaAg(s) ou em LnAg(s) e número de epítomos preditos de proteínas identificadas nas duas frações imunodominantes.

5.5. Determinação dos potenciais alvos vacinais proteicos

De acordo com os critérios descritos anteriormente (abundância, baixa similaridade a proteínas humanas, maior número de epítomos de células B em pelo menos quatro de seis preditores, maior número de ligantes de HLA II ou de HLA I e ligação ao maior número de alelos de HLA), foram selecionadas 10 proteínas potencialmente mais imunodominantes. O conjunto dos dados de predição, relacionados a estas proteínas está descrito na tabela 5.3. 16 proteínas foram selecionadas para a análise seguinte, considerando-se que diversas proteínas selecionadas foram selecionadas por mais de uma análise.

Em todas as análises de predição de epítomos realizadas, foi possível verificar um maior número de epítomos preditos em proteínas com maior tamanho de sequência.

Das 16 proteínas selecionadas, 7 proteínas apresentaram predições positivas para todos os tipos de epítomos analisados e 6 proteínas não

apresentaram epítomos de células B, embora tenham sido abundantes nas respectivas frações de proteínas solúveis, com faixa de peso molecular previamente reconhecida por anticorpos. Dessas 6 proteínas, 3 apresentaram epítomos preditos de HLA de classes I e II; 2 apresentaram epítomos apenas para HLA II e 1 apenas para HLA I.

Todas essas proteínas apresentaram ligações a todos, ou a quase todos os alelos de HLA I e/ou II e algumas proteínas apresentaram apenas epítomos reconhecidos por células B. A estrutura tridimensional das proteínas selecionadas como potenciais candidatos vacinais encontra-se na figura 5.29. Nessa figura também é possível localizar os epítomos conformacionais de cada proteína.

Tabela 5.3: Proteínas selecionadas de acordo com a abundância, baixa similaridade a proteínas humanas, número de cada um dos três tipos de epítomos preditos e com promiscuidade dos epítomos a HLA de classes I ou II.

Uniprot		ABCpred	Net-MHCII	NetCTL pan		Perseus	Blastp		
ID	Proteína	Epítomos lineares de células B	Epítomos HLA II	Alelos de HLA II	Epítomo s HLA I	Alelos de HLAI	Média LFQ*	SH(%)*	(aa)
E9A TV9	Uncharacterized protein	351	1649	23	661	27	22	SI	3423
A0A088RNC4	9TRYP Uncharacterized protein	121	995	22	443	27	22	SI	2628
E9A YV2	Putative calpain-like cysteine peptidase	574	813	23	130	27	26	24	4341

E9A NN3	Uncharac terized protein	100	675	22	217	27	23	28	1007
A0A 088 S1Z 8	9TRYP Uncharac terized protein	-----	558	22	276	27	23		1145
E9A QY8	Uncharac terized protein	81	552	23	216	27	21	SI	867
A4H 7P6	Putative immunod ominant antigen	-----	504	22	-----	-----	23	SI	846
A4H 6M6	Pyruvate, phosphat e dikinase	-----	472	23	-----	-----	25	SI	914
E9B 4N8	Uncharac terized protein	180	407	22	217	27	23	SI	2005
E9A JR2	FYVE- type domain- containin g protein	133	276	19	-----	-----	22	30	1372
E9A QV6	<i>Paraflage</i> <i>llar rod</i> <i>protein</i> 2C	-----	157	19	953	27	23	SI	668
A4H 7T4	Putative kinesin K39	98	-----	-----	-----	-----	22	20	1057
E9A PZ2	C2 domain-	97	-----	-----	-----	-----	25	SI	966

E9A	Uncharac g protein									
YH6	terized protein	86	-----	-----	-----	-----	26	SI	801	
Q4Q	Uncharac protein									
BL4	terized protein	91	-----	-----	327	27	22	SI	2009	
E9A	<i>Putative</i>									
P43	<i>carboxy- peptidase</i>	-----	-----	-----	225	27	24	SI	503	
Total		16								

*Abundância

**SI: Sinal impreciso de similaridade.

***Valores ordenados do maior para o menor número de epítomos de HLA II.

5.6. Análise de homologia

As proteínas selecionadas como potenciais alvos vacinais mais imunodominantes (tabela 5.3) foram analisadas quanto à homologia em relação às proteínas de espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, com sequências disponíveis nos bancos de dados utilizados. Essa análise, teve o propósito de identificar potenciais alvos vacinais proteicos pan específicos a serem usados contra diferentes espécies de *Leishmania*.

As proteínas analisadas apresentaram homologia, em sua maior parte, para as espécies *L. mexicana* e *L. infantum* (16 proteínas), assim como para *L. braziliensis* e *L. major* (15 proteínas) (tabela 5.4). Apenas 2 proteínas apresentaram homologia a *L. panamensis* e *L. tarentolae*.

Das proteínas analisadas, 7 apresentaram predição de homologia para todas as espécies de *Leishmania* da análise e 5 proteínas apresentaram proteínas homólogas em 6 das espécies analisadas. Dentre essas 7 proteínas, a proteína “*Putative calpain-like cysteine peptidase*” (ID Uniprot E9AYV2) apresentou maior número de proteínas homólogas, seguida da “*Uncharacterized protein*” (ID Uniprot E9ANN3). (fig. 5.28).

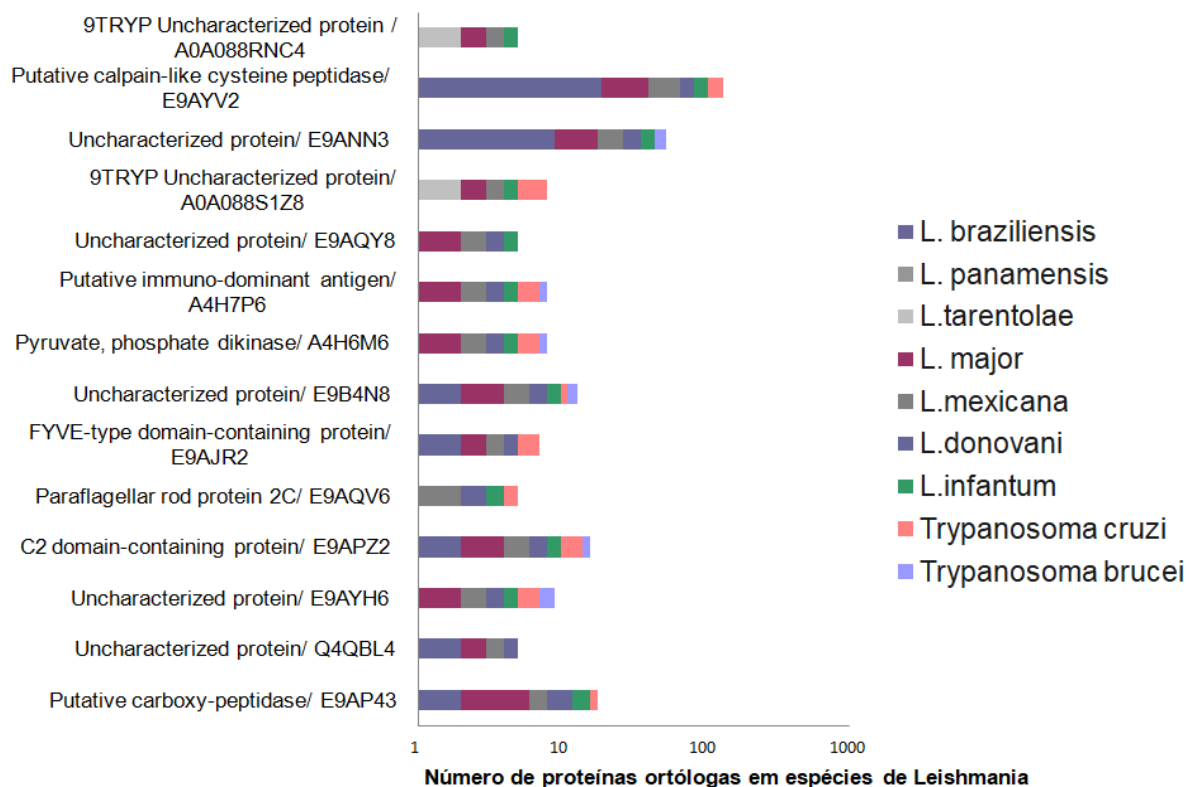


Figura 5.28. Homologia de potenciais alvos vacinais proteicos para as principais espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. Eixo x: Descrição dos alvos proteicos, com seus respectivos identificadores Uniprot. Eixo y: número de proteínas homólogas em cada espécie (valores em log na base 10) A proteína Putative kinesin K39 (Fragment/ A4H7T4) apresentou apenas 1 proteína homóloga a 1 espécie, não aparecendo no gráfico.

Tabela 5.4: Homologia entre proteínas identificadas como potencialmente mais imunodominantes e espécies de parasitos do gênero *Leishmania*

Antígeno	LaAg(s)/LnAg(s)										
	Putative calpain-like cysteine peptidase/E9AYV2	Uncharacterized protein/E9ANN3	Uncharacterized protein/E9AQY8	Putative immunodominant antigen/A4H7P6	Uncharacterized protein/E9B4N8	FYVE-type domain-containing protein/E9AJR2	Putative kinesin K39 (Fragment/A4H7T4)	Uncharacterized protein/Q4QBL4	Tamanho da seq (aa)	Massa molecular (Kda)	Espécie/ Número de proteínas homólogas
	4341	1007	867	846	2005	1372	1057	2009			
	489,116	106,156	94,193	91,049	223,816	151,069	117,042	219,862			
<i>L. braziliensis</i>	19	9	1	1	2	2	1	2			
<i>L. panamensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>L. tarentolae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>L. major</i>	21	9	1	1	2	1	0	1			
<i>L. mexicana</i>	27	9	1	1	2	1	0	1			
<i>L. donovani</i>	17	9	1	1	2	1	0	1			
<i>L. infantum</i>	20	9	1	1	2	0	0	0			
Total espécies/proteínas homólogas	5/104	5/45	5/5	5/5	5/10	4/5	1/1	4/5		4/5	

Tabela 5.4 (continuação): Homologia entre proteínas identificadas como potencialmente mais imunodominantes e espécies de parasitos do gênero *Leishmania*

Antígeno	LnAg(s)			LaAg(s)			
	9TRYP Uncharacterized protein / A0A088RNC4	9TRYP Uncharacterized protein / A0A088S1Z8	Pyruvate, phosphate dikinase/ A4H6M6	Paraflagellar rod protein 2C/ E9AQV6	C2 domain-containing protein/ E9APZ2	Uncharacterized protein/ E9AYH6	Putative carboxypeptidase/ E9AP43
Tamanho da seq (aa)	2628	1145	914	668	966	801	503
Massa molecular (Kda)	286,605	126,342	100,633	76,114	108,727	89,475	57,251
Espécie/ Número de proteínas homólogas							
<i>L. braziliensis</i>	0	0	1	1	2	1	2
<i>L. panamensis</i>	1	1	0	0	0	0	0
<i>L. tarentolae</i>	1	1	0	0	0	0	0
<i>L. major</i>	1	1	1	0	2	1	4
<i>L. mexicana</i>	1	1	1	1	2	1	2
<i>L. donovani</i>	0	0	1	1	2	1	4
<i>L. infantum</i>	1	1	1	1	2	1	4
Total espécies/proteínas homólogas	5/5	5/5	5/5	4/4	5/10	5/5	5/16

Foram selecionadas 11 proteínas, como potenciais candidatas vacinais, com base na abundância, baixa similaridade a proteínas humanas, predição de reconhecimento por células T e B e na conservação entre diferentes espécies de *Leishmania*. Assim, as proteínas determinadas por esse estudo como potenciais alvos vacinais são as descritas na tabela 5.5.

Tabela 5.5: Proteínas selecionadas como potenciais alvos vacinais

Grupo proteico	ID (Uniprot)
<i>Putative calpain-like cysteine peptidase</i>	<i>E9AYV2</i>
<i>Uncharacterized protein</i>	<i>E9ANN3</i>
<i>Putative carboxy-peptidase</i>	<i>E9AP43</i>
<i>Uncharacterized protein</i>	<i>E9B4N8</i>
<i>Uncharacterized protein</i>	<i>E9AQY8</i>
<i>C2 domain-containing protein</i>	<i>E9APZ2</i>
<i>Uncharacterized protein</i>	<i>E9AYH6</i>
<i>Putative immuno-dominant antigen</i>	<i>A4H7P6</i>
<i>Pyruvate, phosphate dikinase</i>	<i>A4H6M6</i>
<i>9TRYP Uncharacterized protein</i>	<i>A0A088S1Z8</i>
<i>9TRYP Uncharacterized protein</i>	<i>A0A088RNC4</i>
<i>Total</i>	<i>11</i>

Imagens das respectivas estruturas tridimensionais (disponíveis no PDB) das proteínas selecionadas como potenciais alvos vacinais, encontram-se na Fig. 5.28. Não foi possível obter as estruturas das proteínas *Uncharacterized protein* (*E9B4N8* e *E9ATV9*) nem da proteína *Pyruvate phosphate dikinase* (*A4H6M6*).

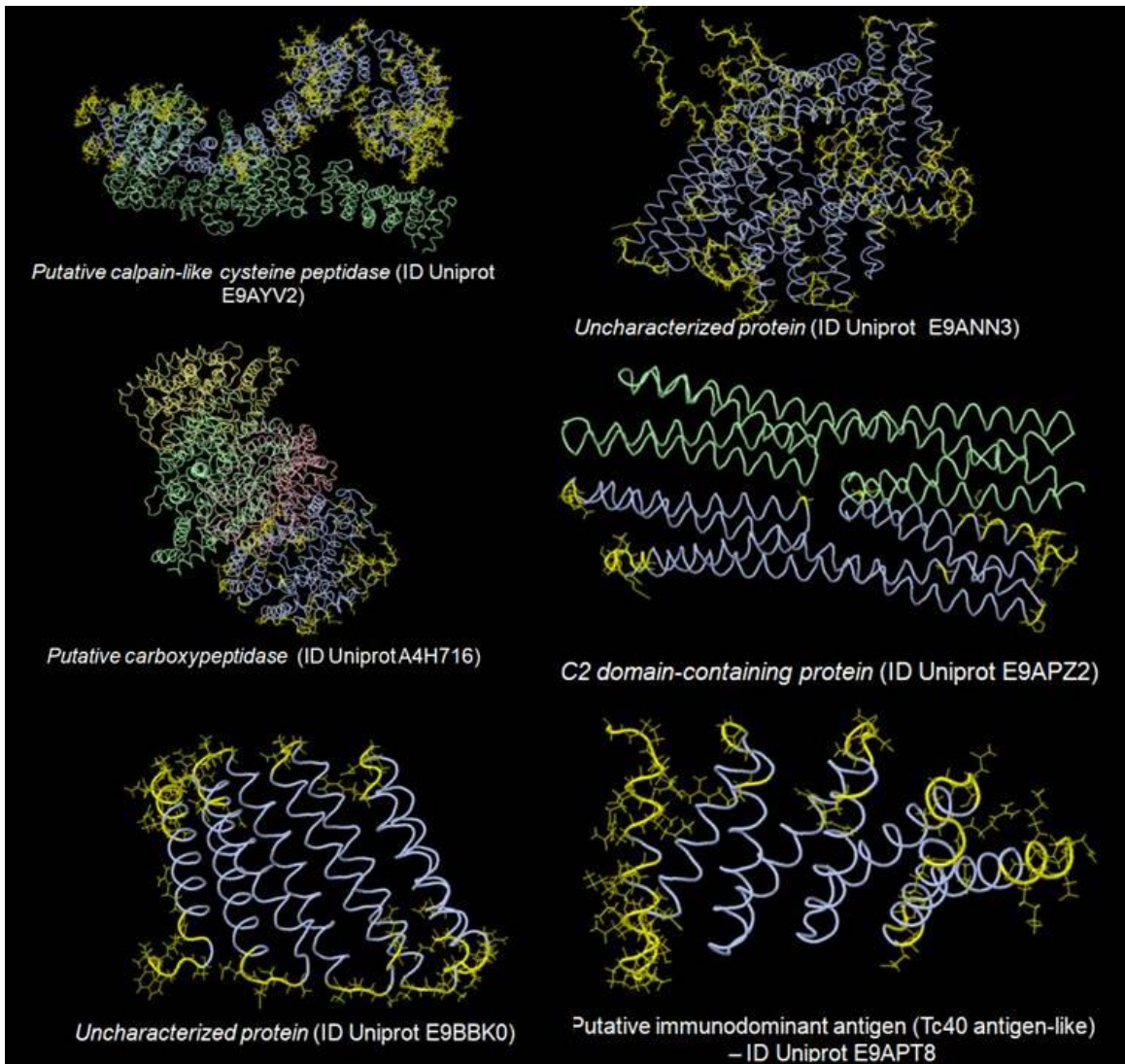


Figura 5.29: Imagens obtidas pelo programa Discotope, disponível no PDB, da predição da estrutura tridimensional de proteínas modeladas, estabelecidas nesse estudo como alvos vacinais. Em amarelo, posição dos epítomos conformacionais reconhecidos por BCR.

De acordo com as análises realizadas e mencionadas acima, essas proteínas mostraram-se mais abundantes nas frações imunodominantes; localizam-se, predominantemente no citosol ou no núcleo, estão relacionadas à síntese ou à degradação de carboidratos e de proteínas, apresentam baixa similaridade a proteínas humanas. Esses resultados também demonstram que essas proteínas são potencialmente mais imunodominantes na afinidade e promíscuas na ligação a diferentes alelos a HLA e também têm alta afinidade a BCR, sendo conservadas em pelo menos 5 espécies de *L. Viannia* ou de *L.*

Leishmania, além de estarem presentes em *L. amazonensis*, *L. naiffi*, ou em ambas as espécies.

6. Discussão

Estudos anteriores no modelo murino demonstraram a eficácia protetora de antígenos totais de *L. (L.) amazonensis* (LaAg) e de uma vacina de DNA (LACK DNA) administrados pela via intranasal (IN) contra a infecção por *L. (L.) amazonensis* (Pinto et al. 2004). Trabalhos recentes do nosso grupo demonstraram que o antígeno LaAg administrado por via intranasal também induz proteção contra a infecção por *L. (V.) braziliensis* no modelo hamster (Da Silva Couto et al, 2015). No entanto, estudos que avaliem a proteção vacinal induzida por antígenos de espécies do subgênero *Viannia* ainda são escassos.

Assim, a partir dessas observações e visando identificar antígenos vacinais provenientes de espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, foi demonstrada, em um primeiro momento a proteção conferida por antígenos totais de *L. (V.) naiffi* (LnAg) administrados por via IN contra a infecção por *L.(V.) braziliensis* no modelo hamster, em comparação com a administração pela via IM. A imunização intranasal com antígeno LbAg não protegeu hamsters contra a infecção homóloga por *L.(V.) braziliensis*.

Outros resultados do grupo mostraram que a espécie *L. (V.) naiffi* produz uma ativação de macrófagos diferenciada, em relação a *L. (V.) braziliensis*, levando a uma destruição mais lenta do parasito internalizado *in vitro*. Essa característica pode ser associada ao dano tecidual mais brando dos tecidos adjacentes às lesões, em relação às outras formas clínicas de LTA. O antígeno solúvel desse parasita, denominado de LnAg(s) induz, de forma muito eficiente, resposta linfocitária *in vitro*, além de se observar uma produção de IFN- γ bem modulada. Esses antígenos apresentam uma alta frequência no soro de voluntários de área endêmica, infectados naturalmente com diferentes espécies do gênero *Leishmania*, mesmo quando usados como antígenos heterólogos (Camacho Matta 2005).

Esses resultados evidenciam que a espécie *L. naiffi* pode prover alvos vacinais contra leishmanioses em populações geneticamente heterogêneas e de áreas onde ocorre simpatria das espécies de *Leishmania*.

O mapeamento de todo o genoma disponível, de *Leishmania* tem sido a estratégia mais amplamente usada, por diversos grupos de pesquisa, para identificar epítomos de células T, na busca por alvos vacinais contra as leishmanioses (Singh et al (2015). Nesse estudo, o ponto de partida foi o proteoma de uma fração solúvel imunodominante, de *Leishmania naiffi*, que foi comparado com a fração eletroforética, de mesmo tamanho molecular, de *Leishmania amazonensis*.

Essa e outras estratégias de mapeamento de epítomos, com um ponto de partida experimental, também têm sido utilizadas por diversos grupos. Os estudos de imunogenicidade *in silico* mais bem sucedidos foram aqueles precedidos de uma pré-análise das proteínas, selecionando proteínas com uma melhor caracterização celular e bioquímica e diminuindo o número de epítomos para identificar alvos vacinais contra leishmaniose (Singh et al. 2015; Naouar 2016, Dikhit et al. 2017 e Montalvão et al. 2018).

Essas análises abordam aspectos como a super-expressão em formas amastigotas, exposição na membrana e secreção/ excreção da proteína. Llanes et al (2018), por exemplo, utilizou como ponto de partida para análises de imunogenicidade *in silico* de espécies do subgênero *Viannia*, análises prévias sobre abundância diferencial de expressão de RNAm em formas amastigotas. Do mesmo modo, a fim de se reduzir o quantitativo de sequências a serem analisadas, da amostragem inicial, para a seleção de potenciais alvos vacinais, esse estudo partiu de antígenos solúveis isolados de antígenos totais. Dessa forma, foram eliminados os antígenos de membrana e os antígenos secretados. Posteriormente, a partir desses antígenos solúveis foram selecionadas frações na faixa imunodominante de *L. naiffi*, que também foi utilizada para determinar a fração de *L. amazonensis* a ser estudada. Proteínas com padrão de bandas de eletroforese de alto ou de baixo peso molecular foram também eliminadas nessa etapa. A análise de abundância de proteínas restringiu ainda mais a quantidade de proteínas a serem analisadas, assim como a análise de similaridade. Nessas, as proteínas selecionadas foram alinhadas a proteínas de humanos, cão e hamster, sendo os resultados relacionados a proteínas de humanos. As análises subsequentes, de imunoinformática, tiveram um *input* de proteínas bem menor que a amostragem inicial. Essas também foram análises seletivas para designar as proteínas potencialmente mais imunodominantes. Assim, também, posteriormente,

a análise de homologia, as proteínas mais conservadas, entre espécies de *Leishmania*, foram identificadas, desse conjunto final de potenciais alvos vacinais. Consideramos, portanto, com base nos desenhos metodológicos para busca de alvos vacinais, exemplificados na literatura, que a estratégia empregada nesse trabalho foi bem sucedida.

Além de permitir a identificação de alvos vacinais, os resultados obtidos nesse estudo também podem fornecer pistas sobre as características de *L. naiffi* e de *L. amazonensis*, relacionadas à atenuação ou virulência, na interação com o hospedeiro. Resultados esses concernentes a diferenças quantitativas e qualitativas em cada uma das duas frações das espécies estudadas. Essa abordagem necessita de maior aprofundamento e pode ser retomada posteriormente.

A escolha da espécie *L. naiffi* para pesquisa de antígenos a serem usados como candidatos vacinais foi motivado pela observação do perfil da resposta clínica e imunológica bem modulada, resultante da infecção no hospedeiro humano. Em seguida, com o reconhecimento de frações imunodominantes por soros de voluntários curados de área endêmica, foi elaborada a hipótese de que espécies do subgênero *Viannia* poderiam prover antígenos indutores de uma resposta protetora contra espécies do mesmo subgênero. Essa hipótese foi reforçada pelo fato de que a vacina com antígenos de *L. amazonensis* apresentou falhas na eficácia, sendo administrada por via intramuscular em voluntários de área endêmica do subgênero *Viannia* (Silveira et al. 2008).

Assim, esse trabalho é o primeiro a investigar antígenos de *L. naiffi*, para identificar possíveis alvos vacinais contra a doença.

Por outro lado, o antígeno LaAg tem apresentado eficácia comprovada no modelo hamster dourado, quando a via de imunização é intranasal (Da Silva-Couto et al. 2015). Dessa forma, este trabalho se propôs a identificar alvos vacinais nas frações reconhecidamente imunodominantes da espécie do antígeno LnAg(s) e nas frações de peso molecular equivalente em LaAg(s).

Embora o processamento de antígenos, na infecção por *Leishmania*, seja feito a partir de formas amastigotas, a maior parte do proteoma dessas formas é semelhante ao proteoma de promastigotas. Esse fato favorece a busca de alvos vacinais proteicos, para o desenvolvimento de uma vacina de segunda ou terceira geração, o que poderia ser problemático para uma vacina de primeira geração.

Além disso, o cultivo de promastigotas é mais simplificado e de mais fácil manejo que o cultivo de amastigotas.

Uma limitação para a investigação sobre proteínas expressas abundante e diferencialmente em formas amastigotas, é à existência desses estudos apenas para o subgênero *Leishmania* (Saxena 2007). Nesse estudo foi possível identificar proteínas com alta afinidade de ligação a HLA de classes II e I, além de alta afinidade a BCR, a partir de formas promastigotas metacíclicas do parasito. A adequação do antígeno solúvel já é comprovada, tendo sido demonstrado que proteínas citoplasmáticas e ou secretadas têm maiores chances de serem processadas e apresentadas a células T, que proteínas de membrana (Zutshi et al. 2019), o que valida a escolha feita por esse estudo.

As vacinas de proteínas ou de subunidades apresentam, como vantagens, maior reprodutibilidade e baixo custo, na produção em larga escala, em relação às vacinas de primeira geração, compostas pelo agente etiológico vivo atenuado ou inativado, ou por antígeno total. Os antígenos particulados conferem maior imunogenicidade que os não particulados. Também conferem uma resposta imune mais específica e são antígenos de baixa complexidade (De Brito et al 2018). Esses benefícios justificam a escolha por um desenho vacinal baseado em proteínas.

As vacinas de proteínas apresentam também algumas vantagens, em relação às vacinas de peptídeos. As proteínas mantêm íntegros sítios de clivagem proteossomal, que ficam disponíveis para o flanqueamento, não alterando a imunodominância dos epítomos resultantes. Já foi demonstrado que proteínas multi-epítomos, recombinantes, têm sua dominância diminuída em função dos espaçadores adicionados às sequências, que podem alterar os sítios de clivagem proteossomal e, conseqüentemente, o repertório de epítomos gerados e a apresentação pelas APCs aos linfócitos T naives (Moss et al. 2019 e Kim et al. 2017).

O conceito de imunodominância, que é o fundamento principal desse trabalho, refere-se à tendência ou à preferência para que um epítomo seja selecionado para apresentação por via HLA I ou II (considerando-se o sistema imune humano), a partir de uma proteína, ou de todo o proteoma, durante a geração de uma resposta imune anti-patogênica (Zutshi et al. 2019). Tal imunodominância é influenciada pela natureza intrínseca do epítomo, afinidade

epítipo-HLA, abundância do antígeno, promiscuidade da ligação do antígeno e pelas regiões de flanqueamento dos peptídeos (Sercarz et al. 1993 e Chen et al. 2006, apud Zutshi et al. 2019). Assim, as análises de imunoinformática permitiram, nesse trabalho, determinar o potencial imunodominante das proteínas identificadas e pré-selecionadas como alvos vacinais, com base, principalmente, nesse critério.

A vacinologia reversa permite uma definição mais rápida e apurada de alvos vacinais, com base em bancos frequentemente alimentados por dados obtidos experimentalmente e em algoritmos também validados. Essa ferramenta tem sido amplamente empregada por diversos grupos de pesquisa no mundo, na busca de formulações vacinais proteicas ou peptídicas, contra diversas doenças infecciosas e degenerativas.

Uma das limitações nas análises de proteômica de *Leishmania* é a ausência do proteoma completo da maior parte das espécies do subgênero *Viannia*, inclusive de *L. (V.) naiffi* (Coughlan et al. 2018). Isso se deve ao fato de que a maior parte das investigações em alvos vacinais e terapêuticos tem focado em espécies de *Leishmania* predominantes no Velho Mundo. No entanto, genomas referências dos dois subgêneros (espécies *L. braziliensis* e *L. major*, por exemplo) estão disponíveis, assim como seus respectivos proteomas referência (Peacock et al. 2007 e Ivens et al. 2005), o que permitiu a identificação de proteínas nesse estudo, embora esse seja um fator limitante para a identificação de proteínas espécie-específicas. Diversas proteínas homólogas, dessas espécies, apresentarem grandes divergências de identidade, para proteínas de *L. naiffi* e de *L. amazonensis*, respectivamente. Por essa razão, foram selecionadas apenas proteínas identificadas com mais que 90% de cobertura da sequência e que apresentassem, no mínimo, dois peptídeos únicos (Llanes et al. 2015).

A quantificação das proteínas dessas frações resultou em um número relativamente baixo, em relação ao proteoma total das duas espécies referência, mas cabe lembrar que alguns passos prévios foram seguidos, que permitiram excluir a maior parte das proteínas, da análise *in silico*.

A escolha do gel SDS PAGE 1D, como método de fracionamento, teve o objetivo de reproduzir as condições metodológicas de identificação da faixa imunodominante de *L. naiffi*, anteriormente aplicada pelo grupo do LIPMED-IOC. Embora esse objetivo tenha sido alcançado, podem ocorrer, também, perdas de proteínas por esse método. Em contrapartida, pode-se dizer que essa limitação do

método acabou por selecionar, para as análises posteriores, as proteínas mais abundantes na fração, que apresentam menores perdas quantitativas.

O primeiro passo do estudo foi a obtenção das frações na faixa de ~35 kDa a ~100 kDa, conforme definido previamente, como mais imunodominante do antígeno solúvel de LnAg e a faixa de tamanho molecular equivalente de LaAg. Camacho (2005) demonstra que o perfil eletroforético, além de variar, de acordo com a espécie do parasito, com as cepas e seus respectivos números de passagens. No nosso estudo, o perfil eletroforético das duas amostras não diferiu, a não ser pela quantidade de proteínas.

Os resultados de proteômica demonstraram que, apesar da semelhança entre os perfis de gel, os dois antígenos divergiram em cerca de 45% de suas respectivas proteínas. Camacho (2005) também observou diferenças entre diferentes antígenos, quanto à frequência de reconhecimento de bandas, em *immunoblot*, por soros de pacientes de CL curados. Com base nesses dados é necessário comprovar, experimentalmente, se a fração imunodominante em LaAg(s) é a mesma que a de LnAg(s). Esse dado pode ser importante para um melhor entendimento das diferenças de imunopatogênese das doenças causadas pelas duas espécies e da indução de proteção e de resistência ou susceptibilidade à infecção.

Nossos achados sobre a relação entre proteínas de LaAg(s) e de LnAg(s), na faixa imunodominante, mostraram que cerca de metade das proteínas de ~35 a ~100 kDa de LnAg(s) não foram identificadas em LaAg(s), o que é recíproco. Contudo, para afirmarmos que houve proteínas exclusivamente expressas por uma espécie ou outra, são necessários abordagem técnica de fracionamento que garanta menor perda de proteínas, bem como cromatografia e espectrômetro de massas com maior resolução e sensibilidade.

Assim, foi cumprido o primeiro objetivo específico desse projeto, de produzir antígenos solúveis, a partir de antígenos totais de LaAg e LnAg e fracioná-los, por SDS-PAGE, para análise proteômica da faixa imunodominante previamente identificada.

Após serem excluídas do estudo, proteínas de membrana e proteínas da fração solúvel, de tamanho molecular fora da faixa de ~35 kDa a ~100 kDa, foi utilizada a estratégia para mineração de proteínas na fração proteica imunodominante resultante, como já mencionado.

Além do repertório de proteínas e das vias de interação entre as mesmas, o quanto uma proteína é abundante dentro de uma mistura complexa de proteínas é outro fator considerado relevante para o estabelecimento de um alvo vacinal. De fato, a expressão abundante de determinadas proteínas, juntamente com outros fatores, pode estar relacionada aos níveis de proteção vacinal, pela predominância na indução de resposta imune antígeno-específica (Aebischer, 2014).

Também a abundância das proteínas está relacionada à sua disponibilidade para a degradação dependente de proteases, no interior das APCs (Juncker et al. 2009). A correlação entre abundância e a preferência de proteínas superexpressas na apresentação por HLA também já foi demonstrada em células cancerígenas (Bassani-Sternberg et al. 2015). Estas razões nos motivaram a realizar uma análise quantitativa baseada nas intensidades dos espectros de massas das proteínas identificadas. As proteínas que estavam mais abundantes nas frações analisadas, de acordo com o valor de LFQ calculado, foram consideradas como potenciais alvos vacinais, sabendo-se que, como mais disponíveis para processamento proteolítico, também podem prover peptídeos com mais afinidade a HLA, o que faz total sentido, evolutivamente. Nesse sentido, a maior abundância pode representar maior imunodominância. Nossa análise mostrou que as proteínas potencialmente mais imunodominantes, em termos de abundância, são conservadas entre as espécies e foram identificadas de forma comum nas frações solúveis de Ln e La.

Além da abundância, a ontologia das proteínas é outra característica que poderia estar relacionada à imunodominância das mesmas. Já foi observado que a localização celular da proteína, em formas amastigotas de *Leishmania* faz variar o processamento de antígenos e a apresentação dos mesmos (Wolfram et al. 1996). Neste trabalho foram preditas características ontológicas das proteínas do parasito na forma promastigota. Considerando-se que tais características estão relacionadas à sua estrutura química e tridimensional, à origem genética e evolutiva, nos principais preditores, essas características não mudam, se as proteínas encontram-se nas duas formas (amastigotas e promastigotas), podendo variar as isoformas das proteínas analisadas de um estágio evolutivo para outro (Amiri-Dashatan et al. 2020).

Nesse estudo, as proteínas identificadas não foram classificadas quanto ao estágio evolutivo – se diferencialmente expressas em promastigotas ou não. No entanto, o reconhecimento das mesmas por soros de pacientes de área endêmica,

curados de LTA, pode sugerir que essas proteínas apresentam antígenos presentes também em formas amastigotas. Assim, se as proteínas identificadas como alvos vacinais também são expressas em amastigotas, como a maior parte das proteínas em *Leishmania*, e considerando-se que essas proteínas estão dentre as mais conservadas evolutivamente, é possível relacionar sua ontologia à imunodominância e à imunopatogênese, considerando-se os processos biológicos, vias e funções moleculares em que estão envolvidas. Os resultados relacionados às características ontológicas desse trabalho foram limitados pela carência de informações nos bancos de dados, não podendo representar a totalidade das proteínas das frações imunodominantes analisadas. No entanto, foi possível observar que a maior parte das proteínas mais abundantes na fração antigênica solúvel de LnAg e na fração equivalente de LaAg, são encontradas no citoplasma e no núcleo da célula parasitária. Nessas sublocalizações celulares, a maior parte das proteínas preditas foram relacionadas às vias e processos biológicos de degradação de carboidratos e proteínas, glicólise e homeostase redox-celular.

Considerando-se que tais proteínas foram alvo do processo de clivagem proteassomal, no interior de APCs do hospedeiro e que para tal, elas devem ser mais abundantes, pode-se inferir que esses processos e vias estão entre os predominantes nas células do parasito, durante a infecção. As proteínas imunodominantes envolvidas nesses processos podem também estar relacionadas a aspectos importantes da imunopatogênese das leishmanioses.

Pode-se observar que proteínas das duas frações contêm proteínas que estão envolvidas, predominantemente, na manutenção da homeostase redox e energética do parasito. Porém, é possível observar diferenças nas predições dessa ontologia entre as frações. Foram preditas mais proteínas da fração de LaAg(s) envolvidas numa variedade maior de processos e vias, que de LnAg(s). Enquanto a ontologia das proteínas imunodominantes de LnAg(s) está mais relacionada à tradução e ao metabolismo de aminoácidos, percebe-se que as proteínas equivalentes, de LaAg(s) estão envolvidas em processos que vão do metabolismo de nucleotídeos ao processamento de proteínas, passando pela tradução e culminando com a proteólise. Embora esses dados sejam limitados pela carência de informações nos bancos de dados, não representando a totalidade das proteínas analisadas, é possível estabelecer algumas relações com dados experimentais anteriores.

Resultados de Camacho et al. (2015) sugerem que *L. naiffi* permanece por mais tempo nas células infectadas que outras espécies do gênero *L. Viannia*. A consequência dessa característica pode ser uma maior atenuação da infecção, representada pelo tempo maior que o processamento de antígenos leva para ocorrer em *L. naiffi*. Por outro lado, a intensa atividade metabólica de *L. amazonensis*, no interior da célula, pode estar relacionada à sua maior virulência, à maior multiplicação, na célula do hospedeiro e à ativação das respostas imunológicas características da infecção por essa espécie. As características diferenciais dessa espécie e as respectivas proteínas relacionadas podem ser indicadoras da sua patogenicidade. Peacock e colaboradores (2007) demonstram que genes diferencialmente distribuídos entre diferentes espécies de *Leishmania*, expressam proteínas envolvidas em interações patógeno-hospedeiro e na sobrevivência do parasito no interior dos macrófagos. Assim, proteínas relacionadas a processos e características diferenciais em *L. amazonensis*, relacionadas à sua virulência, devem ser evitadas como candidatas vacinais.

Para um melhor entendimento da relação da ontologia das proteínas analisadas com a imunopatogênese das leishmanioses, outras investigações *in silico* deverão ser realizadas. Essa análise foi apenas descritiva, com o objetivo de caracterizar as proteínas mais abundantes das frações imunodominantes.

A análise que permitiu uma seleção mais refinada a partir de proteínas abundantes das frações imunodominantes de LnAg(s) e de LaAg(s) foi a análise de similaridade de proteínas. Nessa análise, o objetivo foi selecionar, como candidatos vacinais, proteínas com baixa similaridade a proteínas humanas.

Essa característica é importante, no desenvolvimento de vacinas de subunidades, a medida que não sejam empregadas, na composição vacinal, proteínas que gerem uma resposta inespecífica ou que atuem como mimetópos, capazes de gerar uma resposta auto-imune, como ocorre com o reconhecimento cruzado de proteínas próprias, pelo sistema imune humano, pela formação de auto-anticorpos, em decorrência da infecção por diversos microorganismos (Wilson et al. 2000 e Weber et. al. 2009).

Além de se comparar as proteínas selecionadas das frações imunodominantes frente ao proteoma humano, também foi investigada, concomitantemente a similaridade dessas proteínas em relação a proteínas de cão. Essa escolha se deu pela importância de se obter alvos vacinais para uma vacina

eficaz contra a leishmaniose canina, mesmo não sendo este o alvo principal desse trabalho. A vacinação para cães juntamente com a vacinação de humanos e com as medidas sanitárias cabíveis podem representar uma profilaxia mais efetiva no combate das leishmanioses. Assim, como poucos trabalhos de desenvolvimento de vacinas para cães contêm esse tipo de análise, os dados gerados podem servir para estudos subsequentes.

O proteoma de hamster também foi utilizado na análise de similaridade das proteínas selecionadas das frações. Essa investigação baseia-se na preferência pelo modelo hamster para posteriores estudos, no desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose para uso humano. Assim, é importante que essas proteínas tenham o mesmo efeito no modelo em que serão testadas.

Foram escolhidas proteínas bem caracterizadas experimentalmente, para controles das análises de predição de epítomos, a fim de serem mais uma validação para os métodos e para parâmetro dos resultados de cada predição. Foi realizada análise da similaridade dessas proteínas controles em comparação a proteínas humanas, de cão e de hamster.

A *Circunsporozoíte protein*, de *P. falcíparum*, já foi um alvo vacinal amplamente testado e sabidamente produz, predominantemente, uma resposta de anticorpos e também pode produzir uma resposta efetora de células TCD8+ (Cohen et al. 2010, Kaba et al. 2012 e Heide et al. 2019)

O antígeno vacinal HBsAg (Vírus da Hepatite B), induz resposta humoral e é mediador de resposta de células TCD4+ (Leroux-Roels et al. 1994).

A vacinação com o antígeno vacinal *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), produz uma resposta celular de memória, predominantemente TCD4+, T *helper* tipo 1 (Marchant et al. 1999 e Ravn et al. 1997). Tal resposta é característica de patógenos intracelulares intravesiculares (Thakur et al. 2019). No entanto, recentemente, também tem sido destacada a resposta humoral, promovida por esse antígeno (Tanner et al. 2019).

A *Diacylglycerol acyltransferase/mycolyltransferase* Ag85A (*Mycobacterium bovis*) é uma proteína integral, de membrana, que produz resposta humoral e uma resposta de células T CD4+ e CD8+ (Zhang et al. 2017 e Gupta et al. 2018). Essa proteína reflete bem a resposta do antígeno total, como já amplamente demonstrado experimentalmente.

A similaridade entre proteínas é uma característica quantitativa, definida pela percentagem de aminoácidos idênticos, mais os que apresentam a mesma função bioquímica, entre duas ou mais sequências comparadas entre si (Chung et al. 1996). A predição da similaridade entre duas ou mais sequências de proteínas é condicionada a diversas propriedades bioquímicas destas e assim, definidos os limites dessa relação (Jianzhu et al. 2012).

Como esperado, a maior parte das proteínas controles apresentou similaridade igual ou menor a 30% (valor considerado de baixa similaridade). Apenas a proteína HsBAG teve alta similaridade predita, com a *unnamed protéin product human*. No entanto, a cobertura da análise dessa proteína foi inferior a 50%, devendo ser melhor investigada por outros preditores. Esse resultado, no entanto, não interfere na adequação dessas proteínas para comparação com as análises de imunoinformática desse estudo.

Essa análise também reafirma que a ausência de similaridade entre proteínas vacinais e do hospedeiro contribui para que uma composição vacinal seja bem sucedida nos resultados a que se destina. Esse critério foi observado no desenvolvimento da vacina Men B CPS, devido à semelhança do homopolímero ligado ao ácido α -2-8-N-acetil-neuramínico do polissacarídeo vacinal ser estruturalmente idêntico a moléculas de adesão de células neurais de mamíferos, causando a descontinuidade do composto vacinal e alteração do mesmo (Christodoulides, & Heckels 2017).

Porém, diversas proteínas estabelecidas como alvos vacinais contra as leishmanioses não têm sido submetidas à análise de similaridade. Dentre as proteínas mais evocadas em estudos de vacinas para a leishmaniose, a proteína *Lack* (Fernandez et al. 2018), identificada em uma das frações imunodominantes nesse estudo apresentou alta similaridade com proteína humana, de hamster e de cão (73%, 73% e 69%, respectivamente).

Os resultados desse estudo demonstraram que a maior parte das proteínas analisadas apresentou valores de similaridade iguais ou próximos, para os três organismos, especialmente em relação às proteínas com alta similaridade, com valores, aproximadamente de 50% ou com similaridade na faixa de sinal impreciso (valores abaixo de 20%). Nesse sentido, proteínas com baixos valores de similaridade, ou com valores não detectados pelo método BLAST, que sirvam como componentes de uma vacina de uso humano podem, também, servir para

uma vacina para cães. Esses resultados também reafirmaram a adequação do modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) para estudos de desenvolvimento de vacinas, tanto de uso humano como de uso veterinário, à medida que as proteínas selecionadas como alvos vacinais apresentaram baixos valores de similaridade (ou indetectáveis) para proteínas dos organismos vertebrados

Além disso, esses resultados podem representar pistas para investigações mais profundas sobre o desenvolvimento de doenças autoimunes, causadas pela infecção por *Leishmania*, já que as proteínas selecionadas para essa análise foram reconhecidas por anticorpos humanos. A resposta de células B é um forte marcador do lúpus sistêmico eritematoso. Múnera e colaboradores (2020) observaram uma alta similaridade entre proteínas marcadoras de lúpus sistêmico eritematoso e proteínas de *Leishmania* (dentre outros) estabelecendo uma forte relação entre a infecção por esse parasito e por outros microorganismos e o desenvolvimento da doença autoimune em camundongos BALB/c. A ocorrência de autoimunidade também foi relacionada à ocorrência de leishmaniose visceral em recém-nascido (Higel et al. 2015).

Além de possibilitar a seleção de proteínas mais adequadas como alvos vacinais e de fornecer pistas sobre a imunopatogenia da infecção por *Leishmania*, a análise de similaridade de proteínas imunodominantes do parasito, por possibilitar a identificação de proteínas com alta identidade de sequência a proteínas de hospedeiros, contribui para o desenvolvimento de métodos diagnósticos com alta especificidade.

Dessa forma o objetivo se obter um conjunto menor de proteínas para identificação de antígenos vacinais, foi atingido, com os experimentos de quantificação e similaridade.

A busca de antígenos vacinais desse estudo é baseado, primeiramente, na interação parasito-hospedeiro, levando-se, inclusive, em consideração, o fato da infecção ser intracelular e os eventos relacionados à imunopatogenia e à proteção causados por um parasito vivo. Porém, o desenho vacinal proposto por esse trabalho compreende uma composição de subunidades proteicas. Como tal, esse composto vacinal poderá ativar respostas humoral e de células TCD8+, além da já esperada e desejada resposta de células TCD4+. Por isso, os resultados de estudos de vacinas promissoras de subunidades, contra as leishmanioses contribuem muito para se identificar o efeito diferencial desse tipo de composto

vacinal em relação à infecção com o parasito inteiro e vivo. Por outro lado, reafirma-se que, nesse trabalho, a busca por alvos vacinais proteicos tem como alvo mimetizar, ao máximo possível, a resposta protetora observada na infecção por *L. naiffi*. O que, teoricamente, é possível, já que diversas proteínas de subunidade têm esse efeito, em relação à infecção pelos seus microorganismos de origem, como observado com as proteínas controles utilizadas neste trabalho.

Estudos experimentais subsequentes, de eficácia dessas proteínas vacinais, podem também contribuir com mais informações sobre o papel das células TCD8+ e das células B, na proteção contra a leishmaniose.

As subunidades proteicas têm sido a abordagem mais empregada no desenvolvimento de vacinas, inclusive na corrida contra a COVID-19 (das 157 vacinas desenvolvidas (até julho de 2020), 53 são de subunidades). Contra as leishmanioses, essas vacinas também têm sido as mais promissoras. (Shin et al. 2020 e Zutshi et al. 2019).

Embora a resposta imune seja específica para peptídeos apresentados por HLA, a células T, após o processamento proteolítico da proteína antigênica, uma segunda resposta pode gerar um conjunto de peptídeos diferente do gerado na primeira infecção, produzindo um reconhecimento cruzado. Dessa forma, vacinas de segunda geração, baseadas em proteínas, podem disponibilizar um maior número de peptídeos potencialmente imunogênicos, assegurando uma resposta imune mais potente.

O conjunto de proteínas mais abundantes e com baixa similaridade a proteínas humanas foi submetido a análises de imunoinformática, baseadas na resposta celular, que é desejável, para uma vacina contra a leishmaniose e na resposta humoral adaptativa. O número de epítomos preditos para cada proteína foi um dos principais determinantes de seus respectivos potenciais de imunodominância, como descrito por Brito e colaboradores (2017).

A imunodominância da fração composta pelas proteínas estudadas neste trabalho foi determinada, experimentalmente, em estudos anteriores, pelo reconhecimento de anticorpos de voluntários de área endêmica para LTA, curados. A relevância das células B, na proteção contra a leishmaniose está na produção de resposta humoral adaptativa, para o controle da infecção por *Leishmania*, o que já é bem demonstrado, embora essa não seja a resposta primordial nesse controle. A resposta celular é importante para o amadurecimento da resposta humoral (Da-

Cruz et al. 2008). Além disso, as células B, atuando como APCs (mesmo que de uma forma secundária a células dendríticas e a macrófagos), também contribuem para a ativação de células TCD4+, na ativação de outras células B, em plasmócitos e consequente produção de anticorpos e geração de células B de memória.

Assim, outro objetivo desse trabalho foi identificar proteínas com maior número de epítomos de células B, em ambas as frações, o que, juntamente com as análises subsequentes, contribuiu para a identificação de potenciais alvos vacinais proteicos. A importância dos epítomos reconhecidos por células B, na proteção contra patógenos intracelulares também foi confirmada, pela predição desses epítomos de todas as proteínas consideradas controles neste estudo.

Esse estudo foi realizado com os preditores mais usados, para epítomos lineares e não lineares, de células B. Foi possível detectar os epítomos lineares, a partir de todas as sequências de interesse. O que não ocorreu com a detecção dos epítomos conformacionais. A limitação dessa análise, porém está no fato de que a maior parte dos preditores de epítomos de células B foram desenvolvidos visando-se epítomos lineares. A análise de epítomos conformacionais, requer a modelagem tridimensional da proteína, a partir de sua estrutura cristalina. Assim, poucos preditores foram desenvolvidos para essa análise. Além disso, há poucas proteínas do gênero *Leishmania* com sua estrutura tridimensional modelada e depositada em bancos de dados utilizados por esses preditores.

Foi observado que proteínas conservadas entre as frações apresentaram aproximadamente três vezes mais epítomos de células B que as proteínas identificadas apenas em uma ou outra fração. Proteínas identificadas apenas em LnAg(s) apresentaram o menor número de epítomos de células B, considerando-se os resultados de 4 preditores, ao invés de 6, como foi feito para as demais proteínas dessa análise.

Das 10 proteínas que apresentaram maior número de epítomos conformacionais de LaAg(s), 5 proteínas apresentaram esses epítomos nas regiões terminais das proteínas, o que indica que essas são proteínas constituintes do parasito, não sendo secretadas pelo mesmo. As proteínas modeladas de LnAg(s), nas quais foi possível identificar epítomos conformacionais, apresentaram esses tanto nas suas regiões terminais quanto nos seus respectivos cernes. Essa predição pode indicar que essas proteínas sejam exportadas pelo parasito.

Proteínas conservadas entre as duas frações apresentaram mais epítomos conformacionais nas regiões terminais.

As mesmas proteínas analisadas quanto à predição de epítomos de células B foram submetidas à predição de epítomos reconhecidos por células T e promíscuos, quanto à ligação com HLA, para se alcançar o 4º. objetivo desse trabalho.

A afinidade entre epítomos e moléculas de HLA é o principal determinante para a seleção de epítomos imunodominantes para apresentação a células T *naives*. Por isso, esse critério é essencial para a determinação de alvos vacinais (Weaver *et al.* 2008 e Liu *et al.* 1993). A presença de peptídeos ligantes de HLA, apropriados, em uma proteína, é um dos fatores mais importantes para determinação de um alvo vacinal (Setle *et al.* 2002). Com base na evidência *in vitro* de que epítomos que possuem valores de IC 50 ou = 500nM para afinidade de ligação a HLA, são mais imunogênicos, quando testados *in vivo* (Setle *et al.* 1994). Neste estudo foram selecionados os epítomos com esse valor de ligação a diferentes subtipos de HLA. O processamento de antígenos também é um importante critério a ser analisado, pois indica se este está sendo corretamente clivado, transportado e exposto na superfície das células apresentadoras de antígeno (Larsen *et al.* 2007). Assim, os peptídeos ligantes a HLA, selecionados, foram analisados quanto à clivagem proteasomal e ao processamento de antígeno, pelo algoritmo NetCTL.

Nesse estudo, a busca de epítomos baseou-se no perfil predominante, de resposta protetora observado nas leishmanioses (hiperérgico, do tipo Th1) e, principalmente, no tipo de resposta apresentado pela infecção por *L. naiffi*. Essa resposta, como já descrito anteriormente, caracteriza-se pela ativação tardia de macrófagos infectados e pela expressão bem modulada, de INF- γ , induzindo uma resposta do tipo Th1 sem danos teciduais (Camacho *et al.* 2005).

Embora as frações antigênicas tenham apresentado cerca de metade de suas proteínas divergentes, as diferenças numéricas sobre os epítomos encontrados foram baixas. Essa diferença foi mais acentuada em LnAg(s), que apresentou mais epítomos ligantes a HLA II do que LaAg(s). Por outro lado, LnAg(s) apresentou um número ligeiramente menor de epítomos de HLA I que LaAg(s). As duas frações apresentaram quase o dobro de epítomos ligantes a HLA II, em relação a HLA I, o que já era esperado, já que a resposta de células TCD4+ é

predominante na infecção por *Leishmania*. Camacho (2005) observou que antígenos de *L. naiffi* são bons indutores de resposta linfoproliferativa, com indução bem regulada de citocinas, tanto em voluntários infectados com intensa resposta imunopatogênica, quanto nos voluntários infectados com baixas respostas imunes.

A importância de uma vacina que apresente a maior cobertura populacional possível já foi assinalada neste trabalho. A heterogeneidade genética das populações humanas sempre foi um grande desafio para o desenvolvimento de vacinas (Singh et al 2015).

Por isso, além da afinidade de ligação de epítopos a HLA, a promiscuidade desses epítopos em relação à ligação ao maior número de alelos de HLA mais expressos também foi um critério para a seleção de candidatos vacinais. As duas frações apresentaram mais proteínas ligantes aos subtipos de HLA II presentes nas regiões endêmicas de *L. (Viannia)*: HLA-DPA1*01:02/HLA-DPB1*14:01; HLA-DQA1*01:02/ HLA-DQB1*06:02 e HLA-DQA1*03:01/ HLA-DQB1*03:02 (Llanes et al. 2018). Em relação à ligação a HLA de classe I, as proteínas analisadas das duas frações apresentaram mesma proporção de proteínas ligantes entre os diferentes subtipos desse HLA.

Alcançando-se o último objetivo desse estudo, foi possível determinar quais proteínas são melhores alvos vacinais, com base no número de epítopos preditos em todas as análises de imunoinformática realizadas. Assim, foram selecionadas as 10 proteínas que apresentaram maior número de predições de epítopos em cada análise e desse conjunto, foram selecionadas as proteínas que tiveram maiores números de epítopos em todas as análises, totalizando 16 proteínas.

A maior parte dos estudos sobre epítopos de linfócitos T são realizados a partir de espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (Llanes et al. 2018). Além disso, para a análise de epítopos de linfócitos T, é necessária a utilização de mais de um método, para melhor acurácia.

A pesar do genoma de *L. naiffi* ter sido sequenciado (Coughlan 2018), sendo essa uma das espécies do subgênero *Viannia*, predominante na América do Sul, seu proteoma predito não está disponível em bancos de dados públicos. Por isso, poucas proteínas espécie-específicas puderam ser identificadas para *L. naiffi*, o que pode representar uma lacuna num melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro para essa espécie.

Uma importante contribuição do presente estudo, portanto, foi partir da investigação de um antígeno de *Leishmania (Viannia)*, além do antígeno de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Procuramos também, na análise posterior à imunoinformática, identificar e selecionar as proteínas homólogas ao maior número possível de espécies de *Leishmania*, visando-se uma futura composição vacinal que seja panespecífica para esse gênero.

Camacho (2005) demonstrou que antígenos de *L. (V.) naiffi* foram mais reconhecidos, em ensaio de *immunoblot*, por soros de voluntários acometidos por LC, infectados por antígenos de *L. braziliensis* ou por *L. guyanensis* (cepas WHO ou INPA). O antígeno, que foi identificado, neste trabalho, como LnAg(s), também teve o maior número de bandas reconhecido pelos soros dos dois grupos de voluntários, que antígenos de outras espécies. Esses resultados sugerem que epítomos mais conservados no subgênero *Viannia* induzem proteção e que esses são mais reconhecidos, antigenicamente, em *L. naiffi* que em outras espécies do mesmo subgênero.

Nossos resultados demonstram que proteínas mais conservadas, apresentando mais homologia com um maior número de espécies de *Leishmania*, apresentaram maior quantidade de potenciais antígenos reconhecidos por células T e B que proteínas menos conservadas. Nesse estudo, foi demonstrado, também, que essas proteínas apresentam-se abundantes em *L. naiffi* e em *L. amazonensis*. Peacock *et al.* (2007) conclui, em seu trabalho, que devem ser apreciados, como alvos vacinais, fatores que sejam comuns a todas as espécies do gênero *Leishmania*.

Em termos epidemiológicos, a importância de se selecionar proteínas homólogas para diferentes espécies está na exposição da população numa área endêmica a múltiplos parasitos.

Uma das causas mais importantes de se evitar proteínas espécie-específicas em vacinas é a relação das mesmas com a resistência ao tratamento. Tem sido observado que alguns voluntários infectados por *L. naiffi* são resistentes aos tratamentos de 1ª. e de 2ª. linha (Fagundes-Silva *et al.* 2015 e Ducharme *et al.* 2020), assim como voluntários infectados por *L. amazonenses*. Embora, no 1º. caso, essa resistência seja associada à presença do LRV (*Leishmania RNA vírus*), diversos outros fatores de resistência têm sido associados a proteínas, inclusive de *L. amazonensis*.

A análise de homologia desse estudo também demonstrou que proteínas de *L. naiffi* e de *L. amazonenses*, com maior potencial imunogênico, também são mais conservadas entre *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* (dados não apresentados). Esses dados corroboram os achados de Camacho (2005), de que proteínas dos antígenos de *L. naiffi* foram reconhecidas por soros de pacientes com doença de Chagas.

A carência de anotações nos bancos de dados, em relação a espécies dos dois subgêneros de *Leishmania*, foi um limitante também para a análise de homologia. No entanto, foi possível estabelecer e predizer as proteínas com mais proteínas homólogas entre as espécies com informações disponíveis. Das 16 proteínas analisadas quanto à homologia entre espécies de Kinetoplastidae, 11 foram selecionadas, como alvos vacinais. Essas proteínas já têm sido bem descritas na literatura, mas nem todas como componentes vacinais. A literatura fornece um bom parâmetro para a validação experimental dessas proteínas, como alvos vacinais, que passamos a discutir a seguir:

- ***Putative calpain-like cysteine peptidase (E9AYV2)*** – Essa proteína apresenta 4.341 aminoácidos e massa molecular de 489,116 kDa, composta por diversas subunidades (Ohno *et al.* 1986). É codificada pelo gene DB LmxM.27.0510 e pertence à família C2 (cisteínas semelhantes à calpaína). Sua principal função é enzimática, de protease endopeptidase dependente de cálcio, tendo o aminoácido cisteína como seu primeiro grupo nucleofílico de clivagem proteolítica (Sajid & McKerrow 2002). Também atua na apoptose do parasito, transdução de sinal, remodelamento do citoesqueleto mobilidade celular e na progressão do ciclo celular (Dear *et al.* 1997, Ersfeld *et al.* 2005 e Azevedo *et al.* 2017). É uma proteína altamente conservada entre protozoários patogênicos, desempenhando um importante papel na interação parasito-hospedeiro, atuando na penetração celular, hidrólise de proteínas do hospedeiro e do próprio parasito, autofagia, evasão ou modulação do sistema imune do hospedeiro (Williams *et al.* 2013, Siqueira-Neto *et al.* 2018). Em *L. mexicana*, é um componente do citoplasma. Modula a resposta Th1 e a produção de IFN- γ , diminuindo a produção de IL-12. Por outro lado, é capaz, também, de aumentar a transcrição de IL-12 pelos macrófagos infectados, contribuindo para uma resposta pró-inflamatória, induzindo a secreção de IL-6 e TNF- α , além do desenvolvimento de corpúsculos

lipídicos (Cameron *et al.* 2004 e Mottram *et al.* (1996) apud Azevedo *et al.* 2017). Também é um modulador do metabolismo celular e é diferencialmente expressa em cepas de *Trypanosoma cruzi* resistentes a benznidazol (Andrade *et al.* 2008).

As cisteínas proteinases têm sido amplamente empregadas em formulações vacinais com os mais variados desenhos, contra as leishmanioses cutânea e visceral, com resultados promissores de proteção e eficácia, tanto no modelo murino, como no modelo hamster e ainda, em testes clínicos em cães (Tabela 6.1). Por outro lado, esse conjunto de proteínas constitui um reconhecido fator de virulência, em *Leishmania* e também regula outros fatores de virulência importantes, como a GP83 (Mottram *et al.* 1996, Mottram *et al.* 2004, Mahmoudzadeh-Niknam *et al.* 2004 e Casgrain *et al.* 2016). Em *L. amazonensis*, essas proteínas são mediadoras da destruição do complexo antígeno-MHCII pelo parasito (De Souza *et al.* 1995). Sem esse fator, a patogenicidade é diminuída, como observado em *L. mexicana knockout* para genes de algumas proteínas desse grupo. É observada uma maior proteção desses parasitos nulos para cisteínas proteinases, em relação a cepas selvagens, contra a infecção por *L. mexicana* em hamster (Saravia *et al.* 2006). Camundongos, imunizados com *L. mexicana knockout* para outras cisteínas proteinases, também têm proteção aumentada, com uma expressiva resposta Th1 (Alexander *et al.* 1998).

Essa virulência é dependente de uma alta abundância dessas proteínas na célula do parasito (Denise *et al.* 2003). Assim, é necessário um estudo com diferentes concentrações da proteína selecionada como alvo vacinal, nesse estudo, caso a mesma componha uma formulação final para testes de eficácia e proteção. É demonstrado que esse grupo de proteínas apresenta uma expressão diferencial, 3,5x maior, na fase de metaciclogênese de *Trypanosoma cruzi*, que em epimastigotas (Giese *et al.* 2008). Apesar de sua abundância ser maior em formas amastigotas de *L. mexicana*, que em formas promastigotas metacíclicas (Souza *et al.* 1992, Mottram *et al.* 1992), das quais foi extraída, nesse trabalho, apresentou abundância suficiente para ser uma proteína imunodominante, corroborando com os dados de Bart *et al.* 1995 e Mottram *et al.* 1997, que descrevem uma alta abundância também em formas promastigotas.

Apresenta um grande polimorfismo. No presente estudo, essa proteína, originalmente anotada nos bancos de dados, de *L. mexicana*, apresentou uma similaridade baixa a proteínas humanas. Essas características são conhecidas de

isotipos desse grupo de proteínas, identificadas em *L. mexicana* e outras espécies de *Leishmania*, por diversos autores. No entanto, são necessárias outras investigações para o conhecimento de características diferenciais do isotipo identificado nesse estudo, para melhor entendimento sobre a interação deste com o hospedeiro mamífero. Embora diversas composições vacinais em testes experimentais lancem mão de proteínas cisteínas peptidases, não foi encontrada, na literatura, nenhuma validação experimental específica para a proteína *Putative calpain-like cysteine peptidase (E9AYV2)*, identificada neste estudo como potencial alvo vacinal.

- ***Uncharacterized protein (E9ANN3)*** – Essa proteína foi identificada de *L. mexicana* (cepa MHOM/GT/2001/U1103), codificado do gene LmxM.11.0890 (TriTrypDB), apresenta 1007 aminoácidos e massa molecular de 106,156 kDa. Apresenta, também, 100% de identidade com o grupo proteico “*Leucine Rich repeat, putative*”. de *L. donovani*. Como não é uma proteína caracterizada experimentalmente, a literatura carece de informações sobre a mesma. *Boceta et al.* (2000) demonstra que a região de motivos repetidos ricos em leucina é o motivo mais imunodominante da proteína PSA, de *L. donovani*, sendo o principal sítio de ligação com anticorpos humanos ou de cães. Nossos resultados sobre essa proteína são alinhados com esse estudo, já que essa proteína foi uma das mais potencialmente imunodominantes, das frações.

- ***Putative carboxy-peptidase (E9AP43)*** – É uma proteína de 503 aminoácidos, com massa molecular de 57,201kDa. Essa sequência apresenta identidade com uma metalo-peptidase, clam MA(E), família 32 de *L. mexicana*. É codificada pelo gen LMXM_13_0090. Essa enzima catalisa a hidrólise de ligações peptídicas, na extremidade carbóxi-terminal da proteína, utilizando um metal, no sítio ativo. Em *T. cruzi*, esse grupo de proteínas está associado à infectividade do parasito. Magalhães *et al.* (2014) observaram que a expressão dessa proteína em *L. amazonensis* não é alterada, permanecendo constante, ao longo de 150 dias de infecção *in vivo* e *in vitro*, enquanto outras proteínas têm sua expressão aumentada e outras diminuída, ao longo desse tempo. Nosso resultado de abundância dessa proteína corrobora com o de Rodrigues (2017), que também demonstrou que a mesma é uma das mais abundantes em *L. amazonensis* e em *L. braziliensis*. Esse

grupo de proteínas tem sido sugerido como alvo terapêutico anti-*Leishmania* e como antígeno para diagnóstico. No entanto, não é referido em nenhum estudo de desenvolvimento de vacinas.

- ***Uncharacterized protein (E9B4N8)*** – A sequência dessa proteína tem identidade com a proteína não caracterizada de *L. mexicana* (cepa MHOM/GT/2001/U1103). É codificada pelo gen LMXM_33_0690, apresenta 2005 aminoácidos e massa molecular de 223,816kDa. Ainda não há informações disponíveis sobre sua função e identidade. Uma rápida análise de similaridade pelo programa BLASTp, revela que a mesma apresenta 100% de identidade com uma proteína hipotética conservada de *L. mexicana* e 86% de identidade com a *flagellar attachment zone protein, putative*, de *L. donovani*, o que indica que essa pode estar ligada a uma função relacionada ao flagelo do parasito.
- ***C2 domain-containing protein (E9APZ2)*** – Essa sequência identificada neste trabalho também teve identidade com a sequência de *L. mexicana* (cepa MHOM/GT/2001/U1103). A mesma é codificada pelo gen LMXM_14_1440, expresso pela sequência de 966 aminoácidos e massa molecular de 108,727kDa. É uma das muitas proteínas envolvidas no direcionamento de moléculas para a membrana plasmática. Essa função é dependente de Ca⁺. O domínio C2 é altamente conservado, em procariotos (Farah e Sossim 2012). Seu potencial vacinal é indicado contra a infecção pelo nematódeo *Brugia malayi*, causador de dirofilariose linfática (Reamtong *et al.* 2019). No entanto, nenhum estudo relacionando essa proteína à infecção por *Leishmania*.é encontrado, até o momento.
- ***Uncharacterized protein (E9AYH6)*** – Anotada de *L. mexicana*. Essa sequência é codificada pelo gen LMXM_26_1960. Apresenta 801 aminoácidos e massa molecular de 89,475 kDa. Apresenta identidade com sequências conservadas de proteínas hipotéticas de várias espécies de *Leishmania* e cerca de 70% de identidade com a proteína *putative mitochondrial nucleolar protein*, de *Leptomonas pyrrhocoris*.

- **Putative immuno-dominant antigen (A4H7P6)** – A sequência correspondente, identificada nesse estudo teve identidade com a proteína de *L. braziliensis*, codificada pelo gen LBRM_14_0900. Apresenta tamanho molecular de 846 aminoácidos e massa molecular de 91,049kDa. Apresenta função molecular de ligação a outras proteínas. Essa sequência também tem 100% de identidade com a proteína *Tc40-antigen-like*, de *L. braziliensis*. Tem sido descrita como altamente imunogênica, mas ainda não há registros sobre sua aplicação como alvo vacinal. É altamente conservada entre espécies de Kinetoplastidae, apresentou alto reconhecimento por soros de voluntários acometidos por doença de Chagas (Lesénéchal *et al.* 2005).
- **9TRYP Uncharacterized protein (A0A088S1Z8)** - Esta sequência foi identificada de *L. panamensis*, codificada pelo gene LPMP_352910. Apresenta tamanho molecular de 1145 aminoácidos e massa molecular de 126,342 KDa. De acordo com a predição realizada, utilizando-se o banco de dados InterPro, pertence à família das cisteínas peptidases semelhantes à papaína.
- **9TRYP Uncharacterized protein (A0A088RNC4)** - Essa proteína, codificada pelo gene LPMP_352910, identificada a partir do genoma de *L. panamensis*, apresenta tamanho molecular de 1145 aminoácidos e massa de 126,342kDa. Apresenta 90% de similaridade com outras proteínas não caracterizadas, de *Leishmania* e com a proteína *Phytochelatín synthase putative*, identificada em *L. infantum* (Uniprot Consortium).
- **Pyruvate, phosphate dikinase (A4H6M6)** – A sequência identificada nesse estudo teve identidade com a proteína de *L. braziliensis*, codificada pelo gen LBRM_11_0800. É uma proteína altamente caracterizada, que apresenta as atividades catalítica de fosforilação do piruvato, na reação bi-direcional entre piruvato e fosfoenolpiruvato, no ciclo do ácido tri-carboxílico e da gluconeogênese, como também descrito para as duas formas evolutivas de *Leishmania*. (Rodriguez-Contreras *et al.* 2014). Utiliza o Magnésio (Mg²⁺) como co-fator e é ligante de ATP, como predito nas análises desse estudo. Portanto, tem papel relevante no metabolismo energético. Seu tamanho molecular é de 914 aminoácidos e massa molecular de 100,633kDa. É uma proteína altamente conservada, entre eucariotos.

Essa proteína é uma das mais abundantes em parasitos humanos e sua imunodominância foi observada com soro de camundongos infectados por *T. cruzi* Montalvão *et al.* (2018). Ainda não foi descrito nenhum estudo sobre a proteína como alvo vacinal contra a leishmaniose. Sua grande abundância contribui para a infectividade do parasito, assim como a diminuição do número de cópias dessa proteína diminui o potencial infectivo do mesmo (Magalhães *et al.* 2014).

- **Uncharacterized protein/ E9AQY8** - Essa proteína é codificada pelo gene LMXM 17 0130 e foi identificada através do genoma de *L. mexicana*. Apresenta peptídeo sinal, em sua estrutura, 887 aminoácidos e peso molecular de 94,143 kDa. Apresenta 90% de similaridade com outras proteínas não caracterizadas de *Leishmania*. (Uniprot).

A proteína **Paraflagellar rod protein 2C (E9AQV6)**, embora *não tenha sido selecionada na análise de homologia, por apresentar predição de proteínas homólogas abaixo do que foi estabelecido para esse estudo* (mínimo de 5 proteínas homólogas em 5 espécies), é discutida a seguir, por ter atendido a todos os outros critérios de seleção das análises desse estudo e por ser amplamente descrita na literatura. A sequência identificada nesse estudo foi identificada com essa proteína de *L. mexicana*, codificada pelo gen LMXM_16_1430. É uma proteína formada por 668 aminoácidos e massa molecular de 76,114kDa. Está presente nas duas formas evolutivas do parasito, mas é 15 vezes mais expressa em formas promastigotas, que em amastigotas (Moore *et al.* 1996). A localização celular predita e demonstrada experimentalmente, dessa proteína, é no flagelo e sua função molecular, de ligante de calmodulina, na motilidade (Maga *et al.* 1999). A proteína do tipo 2C é parte de uma grande família de proteínas *paraflagellar rod* (Pfam). É altamente conservada no Reino Protozoa (Bastin *et al.* 1996) e foi testada, como candidato vacinal contra a infecção por *Trypanosoma evansi*, com expressiva resposta de anticorpos e de TNF α e INF γ no modelo murino. A proteína similar, paraflagelar 4C, foi testada contra infecção por *T. cruzi* e induziu a produção de células TCD8+ de memória em camundongos. Também foi testada, contra a infecção por *L. mexicana* e *L. panamensis* em hamster, induzindo a produção de anticorpos específicos de memória (Tabela 8.1). Embora seja uma proteína importante para a infectividade do parasito (Moore *et al.* 1996), assim

como a proteína *Pyruvate, phosphate dikinase*, apresenta um decréscimo de cópias, em culturas de amastigotas ou promastigotas de *L. amazonensis* com um grande número de passagens, fazendo diminuir a infectividade do parasito (Magalhães *et al.* 2014).

Tabela 6.1: Validação experimental reportada na literatura, de proteínas potencialmente imunodominantes, identificadas nas frações imunodominantes de LnAg(s) e LaAg(s).

Proteínas	Organismo	Validação experimental como alvos vacinais	Modelo	Alvo da vacina	Proteção
Cisteínas peptidases	<i>L. donovani</i>	Rafati et al. 2005	Cães	LV canina	Sim
		Rafati et al. 2006	Camundongos BALB/c	LV	Sim
		Das et al. 2015			Sim
		Agallou et al. 2017		Parcial	
	<i>L. major</i>	Zahedifard et al. 2014		LC	Sim
		Noormehr et al. 2018*			Sim
Paraflagellar rod protein 2C (E9AQV6)	<i>T. evansi</i>	Maharana et al. 2020	Camundongos albinos Swiss	Tripanosomose	Sim
	<i>T. cruzi</i>	Kurup & Tarleton 2014	Camundongos C57/BL6	Doença de Chagas	Sim
	<i>L. mexicana</i>	Saravia et al. 2005	Hamster	LTA	Não
	<i>L. panamensis</i>				Sim

Apenas o grupo das proteínas cisteínas proteinases das selecionadas nesse trabalho, já foi validado experimentalmente em composições vacinais, em modelo animal. Essas proteínas foram testadas, por diferentes grupos de pesquisa, contra parasitos causadores da LTA ou contra causadores da LV.

A *Paraflagellar rod protein 2C (E9AQV6)* também foi testada como candidata vacinal contra a infecção por outros tripanosomatídeos.

Dentre as 11 proteínas selecionadas nesse estudo, como candidatos vacinais, 7 são proteínas não caracterizadas, ou seja, que não apresentam validação experimental, mas que foram anotadas com base em análises *in silico* de genômica comparativa. Assim, não há informações sobre seu papel na interação

parasito-hospedeiro, a não ser a desse trabalho, que demonstrou que as mesmas estão na faixa imunodominante antigênica e que podem apresentar epítomos reconhecidos por anticorpos humanos. No presente trabalho, essas proteínas, assim como as proteínas caracterizadas, foram as mais abundantes, apresentando alto potencial antigênico, dada a considerável quantidade de epítomos preditos, com afinidade a HLA e a BCR.

Uma vez identificadas as proteínas, será necessário predizer e elaborar o composto vacinal, definindo-se que proteínas estarão nessa composição e quais serão os outros componentes, como o vetor de expressão proteica, adjuvante e dose, por exemplo. Esse próximo passo requer estudos subsequentes.

Assim, também será possível realizar a necessária caracterização experimental, quanto à indução de resposta imune contra infecção por *Leishmania in vitro* e *in vivo*, dessas proteínas.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, propomos uma formulação vacinal potencialmente eficaz contra as formas de LC e contra a LV, visando-se antígenos vacinais proteicos. Que tenha como objetivo uma resposta bem modulada de Th1 e Th2, semelhante à observada na infecção por *L. naiffi*, para impedir a proliferação do parasito nos tecidos infectados, ao mesmo tempo, evitando o dano tecidual, com alta promiscuidade em relação a ligação a HLA, alta cobertura populacional, indutora, também de resposta TCD8+ e de uma resposta humoral adaptativa.

Nesse trabalho, a fração solúvel imunodominante desse antígeno foi produzida experimentalmente e caracterizada por LC-MS/MS e por análises *in silico*. A partir dessa fração, foram identificadas proteínas como potencialmente mais promissoras, no aspecto antigênico, com maior potencial de promiscuidade, quanto à ligação a HLA e mais homólogas entre várias espécies do gênero *Leishmania*. Com esses resultados, além de serem alcançados os objetivos específicos, foi alcançado também o objetivo geral.

As proteínas identificadas nesse estudo podem compor as mais diversas estratégias de formulação, inclusive de uma vacina de 3ª. geração.

7. Conclusões

- As 12 proteínas selecionadas nesse estudo constituem potenciais alvos vacinais imunodominantes e antigênicos, contra a infecção por espécies de *Leishmania* causadoras de LC e de LV;
- A fração estudada, de LaAg(s), equivalente, em tamanho molecular, à fração imunodominante de LnAg(s), também pode ser uma fração imunodominante, já que a mesma apresentou epítomos preditos com alta promiscuidade de ligação a alelos de HLA e com alta afinidade de ligação a essa molécula e a BCR. São necessários estudos experimentais confirmatórios.
- Com base nas análises a partir dos antígenos imunodominantes de *L. naiffi*, é possível inferir que epítomos de antígenos mais conservados na espécie são mais reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro.
- As proteínas vacinais estabelecidas pelas análises desse trabalho, por apresentarem mais ligações preditas a diversos alelos de HLA, tanto de classe I, como de classe II, podem induzir resposta mais policlonal e multiespecífica. Por esse motivo, também, tais proteínas podem servir como formulação vacinal com uma ampla cobertura populacional.
- As frações imunodominantes de LnAg(s) e LaAg(s) têm o potencial de proverem mais antígenos, predominantemente ligantes a HLA II, do que de HLA I e de BCR. Esse dado confirma dados amplamente conhecidos, de que a infecção por *Leishmania* induz uma resposta imune predominantemente de células TCD4+, mas também pode induzir uma resposta associada de produção de anticorpos e a uma resposta TCD8+ menos expressiva.
- Proteínas conservadas de *L. naiffi*, presentes também em *L. amazonensis* e com homologia a proteínas expressas em outras espécies de *Leishmania*, apresentaram o mais alto potencial vacinal, com base na predição de reconhecimento por células B e T.
- Além de serem espécies provedoras de antígenos vacinais, *L. naiffi* e *L. amazonensis* também apresentam características que as tornam provedoras de antígenos promissores para novos testes diagnósticos.

8. Perspectivas

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, será possível dar os seguintes passos:

- Elaborar uma formulação vacinal com combinações das proteínas identificadas nesse trabalho, mais adequadas, de acordo com parâmetros bioquímicos e estruturais, a serem preditos por outras análises *in silico* e por análises experimentais;
- Sintetizar essa formulação vacinal e validar, experimentalmente, os resultados obtidos até aqui, em testes de conceito *in vitro*, em cultura de PBMC humanas (ensaio de linfoproliferação) e *in vivo*, em ensaios de eficácia vacinal, utilizando a via intranasal, contra a LTA e contra a LV no modelo hamster dourado, desafiados com os parasitos *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ou *L. infantum* co-inoculados com saliva de *Lutzomyia*.
- Compreender melhor a imunopatogênese da LTA por *L. naiffi*, a partir das proteínas solúveis imunodominantes, através da extração *label free* dessas proteínas da fração imunodominante e de uma análise proteômica com maior resolução, a fim de se quantificar um maior *set* de proteínas dessa fração.
- Identificar epítomos para testes diagnósticos, com base nas análises de similaridade e de predição de ligação a HLA e a BCR.

REFERÊNCIAS

- Aebisher T 2014. *Leishmania* spp proteome data sets: a comprehensive resource for vaccine development to target visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*: 5(260): 1-8.
- Agallou M, Margaroni M, Athanasiou E, Toubanaki DK, Kontonikola K, Karidi K, Kammona O, Kiparissides C, Karagouni E. 2017. 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*.11(1): e0005311. doi: 10.1371/journal.pntd.0005311.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D 2016. A historical overview of the classification, evolution and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10,. e0004349. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.
- Alexander J, Coombs GH, Mottram JC 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol*;161:6794–801.
- Alexander J, Satoskar AR, Russell DG 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of cell science*, 112 Pt 18, 2993–3002.
- Ali A, Soares S, Barbosa E, Santos A, Barh D 2013. Microbial comparative genomics: an overview of tools and insights into the genus *Corynebacterium*. *J. Bacteriol. Parasitol.* 4 167 10.4172/2155-9597.1000167
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One.* 7(5): e35671.
- Amini H. 1991. Cutaneous lesions with very long duration as a complication of leishmanization. *Iran. J. Public Health* 20: 43–50.
- Amiri-Dashatan N, Rezaei-Tavirani M, Ahmadi N 2020. A quantitative proteomic and bioinformatics analysis of proteins in metacyclogenesis of *Leishmania tropica*. *Acta tropica*, 202, 105227. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica>.
- Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ 2008. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J Proteome Res.*;7(6):2357-2367. doi:10.1021/pr700659m

- Aoun K, Kalboussi Y, BenSghaier I, Souissi O, Hammami H, Bellali H, Bouratbine A 2020. Assessment of Incubation Period of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania major* in Tunisia. *Am J Trop Med Hyg.* doi: 10.4269/ajtmh.20-0439.
- Araujo MSS, de Andrade RA, Vianna LR, Mayrink W, Reis AB, Sathler Avelar R, Mayrink W, Reis AB, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Andrade MC, Mello MN, Martins-Filho AO 2008. Despite Leishvaccine and Leishmune® trigger distinct immune profiles their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26 (18):2211–24
- Azevedo CS, Guido BC, Pereira JL, Nolasco DO, Correa R, Magalhaes KG, Nolasco DO, Corrêa R, Magalhães KG, Motta FN, Santana JM, Grellier P, Bastos IM 2017. Revealing a Novel Otubain-Like Enzyme from *Leishmania infantum* with Deubiquitinating Activity toward K48-Linked Substrate. *Front Chem.* 5:13.
- Bahrami AA, Payandeh Z, Khalili S, Zakeri A, Bandehpour M 2019. Immunoinformatics: In Silico Approaches and Computational Design of a Multi-epitope, Immunogenic Protein. *Int Rev Immunol.*;38(6):307-322. doi:10.1080/08830185.2019.1657426
- Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM 1986. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature.*;322(6081):747-748. doi:10.1038/322747a0.
- Bart G, Coombs GH, Mottram JC 1995. Isolation of *Imcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol.* 73(1-2):271-4.
- Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, Jensen LJ, Mann M 2015. Spectrometry of Human Leukocyte Antigen Class I Peptidomes Reveals Strong Effects of Protein Abundance and Turnover on Antigen Presentation. *Mol. Cell. Proteom.*, 14, 658–673
- Bastin P, Matthews KR, Gull K 1996. The paraflagellar rod of kinetoplastida: solved and unsolved questions. *Parasitol Today.*12(8):302-7.
- Baxevanis AD, Ouelette BFF 2005. *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins.* 3rd. ed. New York: John Wiley & Sons.
- Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D 2002. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol.* 168(8):3992-4000. doi: 10.4049/jimmunol.168.8.3992.

- Bhattacharjee S, Bhattacharjee A, Majumder S, Majumdar SB, Majumdar S 2012. Glycyrrhizic acid suppresses Cox-2-mediated anti-inflammatory responses during *Leishmania donovani* infection. *J Antimicrob Chemother.* 67(8):1905-1914. doi:10.1093/jac/dks159
- Boceta C, Alonso C, Jiménez-Ruiz A 2000. Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite immunology*, 22(2), 55–62.
- Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB 2002. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*: 20: 3277–3284.
- Bosque F, Saravia NG, Valderrama L, Milon G 2000. Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scand J Immunol.* 51(5):533-41.
- Brasil 2014.. Suspensão da licença de fabricação e comercialização do produto Leishmune®. Nota Técnica nº 038/2014/DFIP/SDA. Brasília. (Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/arquivos/nota-tecnica-dfip-38-14-leishmune.pdf/view>)
- Brasil 2017. Manual de Vigilância em Leishmaniose Tegumentar. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf.
- Brasil 2019. Leishmaniose Tegumentar: o que é, causas, sintomas, diagnóstico, tratamento e prevenção. Disponível em <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>
- Brito RC, Guimarães FG, Velloso JP, Corrêa-Oliveira R, Ruiz JC, Reis AB, Resende DM 2017. Immunoinformatics Features Linked to *Leishmania* Vaccine Development: Data Integration of Experimental and In Silico Studies. *Int J Mol Sci*;18(2):371. doi: 10.3390/ijms18020371..
- Brown, R, Jarvis KL, Hyland KJ 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* 180:136-9. 180(1):136-9.
- Burza S, Croft SL & Boelaert M 2018. Leishmaniasis. *Lancet.* 392(10151): doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2

- Camacho Matta NE 2005. Comparação da resposta imune a antígenos de espécies de subgênero *Viannia* de pacientes de áreas endêmicas de *Leishmania Guyanensis* e *L. braziliensis*. Tese (Doutorado) Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz. Rio de Janeiro.
- Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J, Plevin R 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol.*173(5): doi: 10.4049/jimmunol.173.5.3297.
- Carrillo E, Crusat M, Nieto J, Chicharro C, Thomas Mdel C, Martínez E, Valladares B, Cañavate C, Requena JM, López MC, Alvar J, Moreno J 2008. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 26(15):1902-11. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.042.
- Casgrain PA, Martel C, McMaster WR, Mottram JC, Olivier M, Descoteaux A 2016. Cysteine Peptidase B Regulates *Leishmania mexicana* Virulence through the Modulation of GP63 Expression. *PLoS Pathog.*12(5):e1005658 10.1371/journal.ppat.1005658
- Castés M, Agnelli A, Verde O, Rondón AJ 1983. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol* 27:176-186.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2017. Leishmaniasis. Disponível em <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
- Ceva. Lista de Produtos – Leish-Tec, 2019. (Disponível em: <https://www.ceva.com.br/Produtos/Lista-de-Produtos/LEISH-TEC>).
- Chakravarty J, Kumar S, Trivedi S, Rai VK, Singh A, Ashman JA, Laughlin EM, Coler RN, Kahn SJ, Beckmann AM, Cowgill KD, Reed SG, Sundar S, Piazza FM 2011. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 29(19):3531-7.
- Charest H, Matlashewski G 1994. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol.*;14(5):2975-2984. doi:10.1128/mcb.14.5.2975
- Chou PY, Fasman GD 1978. Empirical predictions of protein conformation. *Annu Rev Biochem.*47:251-276. doi:10.1146/annurev.bi.47.070178.001343

- Christodoulides M, Heckels, J 2017. Novel approaches to *Neisseria meningitidis* vaccine design. *Pathogens and Disease*. 75(3):10.1093/femspd/ftx033. doi:10.1093/femspd/ftx033.
- Chung SY, Subbiah S 1996. A structural explanation for the twilight zone of protein sequence homology. *Structure*. 4(10): doi:10.1016/s0969-2126(96)00119-0.
- Cohen J, Nussenzweig V, Vekemans J, Leach A 2010. From the circumsporozoite protein to the RTS,S/AS candidate vaccine, *Human Vaccines*. 6(1): DOI: 10.4161/hv.6.1.9677
- Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Cherwinski HM, Savelkoul HJ, Finkelman FD, Bond MW, Mosmann TR 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 102: 5-28.
- Coler RN, Duthie MS, Hofmeyer KA, Guderian J, Jayashankar L, Vergara J, Rolf T, Misquith A, Laurance JD, Raman VS, Bailor HR, Cauwelaert ND, Reed SJ, Vallur A, Favila M, Orr MT, Ashman J, Ghosh P, Mondal D, Reed SG 2015. From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. *Clin Transl Immunology*. 4(4):e35. doi:10.1038/cti.2015.6.
- Conceição-Silva F, Alves, CR 2014. *Leishmanioses do continente Americano*. Rio de Janeiro: 512p. Editora Fiocruz.
- Convit J, Kerdel-Vegas F, Gordon B 1962. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol.*;74:132-5. doi: 10.1111/j.1365-2133.1962.tb13475.x. PMID: 13881013.
- Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondón AJ 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*;87(4):444-8. doi: 10.1016/0035-9203(93)90030-t. PMID: 8249076.
- Cotugno N, Ruggiero A, Santilli V, Manno EC, Rocca S, Zicari S, Amodio D, Colucci M, Rossi P, Levy O, Martinon-Torres F, Pollard AJ, Palma P 2019. OMIC Technologies and Vaccine Development: From the Identification of Vulnerable Individuals to the Formulation of Invulnerable Vaccines. *J Immunol Res.*;2019:8732191. Published 2019 Apr 28. doi:10.1155/2019/8732191
- Coughlan S, Taylor AS, Feane E, Sanders M, Schonian G, Cotton JA, Downing T 2018. *Leishmania naiffi* and *Leishmania guyanensis* reference genomes highlight genome structure and gene evolution in the *Viannia* subgenus. *R Soc Open Sci*. 5(4): doi:10.1098/rsos.172212

- Coutinho S, Pirmez C, Mendonça S, Conceição-Silva F, Dórea R 1987. Pathogenesis in immunopathology of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 214-228.
- Cox J, Mann M 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.*26(12):1367-1372. doi:10.1038/nbt.1511.
- Croft SL, Olliaro P 2011. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect.*17(10):1478-1483. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x
- Cuervo P, de Jesus JB, Junqueira M, Mendonça-Lima L, González LJ, Betancourt L, Grimaldi G Jr, Domont GB, Fernandes O, Cupolillo E 2007. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasitol.* 154:6-21.
- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito ME, Falqueto A, de Farias Naiff M, Grimaldi G Jr 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different host and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 41: 3126-3132.
- Da Silva-Couto L, Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, Costa BLS, Moreira OC, Gomes-Silva A, Rossi-Bergmann B, Da-Cruz AM, Pinto EF 2015. Intranasal vaccination with leishmanial antigen protects golden hamster (*Mesocricetus auratus*) against *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 9 .e3439. doi:10.1371/journal.pntd.0003439
- Da Silva-Couto L 2019. Hamster dourado como modelo experimental para leishmaniose tegumentar americana: avaliação da resposta imune protetora induzida pela vacinação intranasal e comparação de parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos associados às infecções por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. [Tese de Doutorado]. Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz. Rio de Janeiro, Brasil.
- Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG 1994. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 62(6):2614-8.
- Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG 2000. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (5):569-71. doi: 10.1016/s0035-9203(00)90090-7.

- Da-Cruz AM 2008. *Imunologia em parasitologia 2*. In *Parasitologia – uma abordagem clínica*. Ed. Elsevier. Rio de Janeiro,
- Da-Cruz AM, Pirmez C 2012. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. In: Coura JR (eds). *Dinâmica das Doenças Infecciosas*. 2a. Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Das A, Ali N 2015. Combining cationic liposomal delivery with MPL-TDM for cysteine protease cocktail vaccination against *Leishmania donovani*: evidence for antigen synergy and protection [published correction appears in *PLoS Negl Trop Dis*. 9(10):e0004185.
- Das S, Freier A, Boussoffara T, Das S, Oswald D, Losch FO, Selka M, Sacerdoti-Sierra N, Schönian G, Wiesmüller KH, Seifert K, Schroff M, Juhls C, Jaffe CL, Roy S, Das P, Louzir H, Croft SL, Modabber F, Walden P 2014. Modular multiantigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis. *Sci Transl Med*. 6(234):234ra56.
- De Brito RCF, Cardoso JMO, Reis LES, Vieira JF, Mathias F, Roatt BM, Aguiar-Soares R, Ruiz JC, Resende DM, Reis AB 2018. Peptide Vaccines for Leishmaniasis. *Front Immunol*. 2018;9:1043. Published 2018 May 11. doi:10.3389/fimmu.2018.01043.
- De Brito RCF, Cardoso JMO, Reis LES, Mathias FAS, Aguiar-Soares RDO, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, Corrêa-Oliveira R, Ruiz JC, Resende DM, Reis AB 2019. Synthetic Peptides Elicit Strong Cellular Immunity in Visceral Leishmaniasis Natural Reservoir and Contribute to Long-Lasting Polyfunctional T-Cells in BALB/c Mice. *Vaccines (Basel)*.7(4):162. doi: 10.3390/vaccines7040162.
- De Groot AS, Sbai H, Aubin CS, McMurry J, Martin W 2002. Immuno-informatics: Mining genomes for vaccine components. *Immunol Cell Biol*. 80(3):255-69.
- De Groot AS, Rappuoli R 2004.. Genome-derived vaccines *Expert Rev Vaccines*. 3(1):59-76.
- De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Mendonça SC 1999. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine*.17(9-10):1179-85. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00338-7.
- De Luca PM, Mayrink W, Santiago MA, Nogueira R, Conceição-Silva F, Mélo G, Mendonça SC 2003. Randomized, double-blind, placebo-controlled study on the immunogenicity of the leishmanin skin test. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 97(6):709-12. doi: 10.1016/s0035-9203(03)80109-8.

- De Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II
- Dear N, Matena K, Vingron M, Bohem T 1997. A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics* 45: 175-184.
- Denise H, McNeil K, Brooks DR, Alexander J, Coombs GH, Mottram JC 2003. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infect Immun.* 71(6):3190-5.
- Dey R, Dagur PK, Selvapandiyam A, McCoy JP, Salotra P, Duncan R, Nakhasi HL 2013. Live attenuated *Leishmania donovani* p27 gene knockout parasites are nonpathogenic and elicit long-term protective immunity in BALB/c mice. *J Immunol.* 190(5):2138-49.
- Dias R, Torkamani A. Artificial intelligence in clinical and genomic diagnostics. *Genome Med.* 2019;11(1):70. Published 2019 Nov 19. doi:10.1186/s13073-019-0689-8
- Dikhit MR, Kumar S, Vijaymahantesh, Sahoo BR, Mansuri R, Amit A, Yousuf Ansari M, Sahoo GC, Bimal S, Das P 2015. Computational elucidation of potential antigenic CTL epitopes in Ebola virus. *Infect Genet Evol.* 36():369-375.
- Dikhit MR, Kumar A, Das S, Dehury B, Rout AK, Jamal F, Sahoo GC, Topno RK, Pandey K, Das VNR, Bimal S, Das P 2017. Identification of Potential MHC Class-II-Restricted Epitopes Derived from *Leishmania donovani* Antigens by Reverse Vaccinology and Evaluation of Their CD4+ T-Cell Responsiveness against Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol.*; 8():1763.
- Diro E, Blesson S, Edwards T, Ritmeijer K, Fikre H, Admassu H, Kibret A, Ellis SJ, Bardonneau C, Zijlstra EE, Soipei P, Mutinda B, Omollo R, Kimutai R, Omwalo G, Wasunna M, Tadesse F, Alves F, Strub-Wourgaft N, Hailu A, Alexander N, Alvar J 2019 . A randomized trial of AmBisome monotherapy and AmBisome and miltefosine combination to treat visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.*;13(1):e0006988. doi: 10.1371/journal.pntd.0006988.
- Dowdle W.R 2019. The principles of disease elimination and eradication. Centers for Disease Control (CDC). 48(SU01);23-7. Disponível em <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su48a7.htm#:~:text=Eradication%20has%20been%20defined%20in,and%20as%20reduction%20of%20the>.
- Ducharme O, Simon S, Ginouves M, Prévot G, Couppie P, Demar M, Blaizot R 2020 *Leishmania naiffi* and *lainsoni* in French Guiana: Clinical Features and phylogenetic variability. *PLoS Negl Trop Dis* 14(8): e0008380

- Dunning N 2009. Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *Biosci. Horiz. The International Journal of Student Research.* 2(1). <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzp004>.
- E Silva R de F, Ferreira LF, Hernandez MZ, de Brito ME, de Oliveira BC, da Silva AA, de Melo-Neto OP, Rezende AM, Pereira VR 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.
- Egui A, Ledesma D, Pérez-Antón E, Montoya A, Gómez I, Robledo SM, Infante JJ, Vélez ID, López MC, Thomas MC 2018. Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4⁺ and CD8⁺ T Cells Associated With Infection Control in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 19;8:393. doi: 10.3389/fcimb.2018.00393.
- El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V 2008. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recognit.*21(4):243-255. doi:10.1002/jmr.893.
- Emini EA, Hughes JV, Perlow DS 1985, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol.*;55(3):836-839. doi:10.1128/JVI.55.3.836-839.1985.
- Ersfeld K, Barraclough H, Gull K 2005. Evolutionary relationship and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J Mol Evol* 61: 742-757.
- Etges RJ, Bouvier J, Hoffman R, Bordier C 1985. Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. *Mol Biochem Parasitol.* 14(2):141-9.
- European Vaccine Initiative 2017. LEISHDNAVAX. disponível em <https://www.euvaccine.eu/leishmaniasis/LEISHDNAVAX>.
- Fagundes-Silva GA, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, de Souza MA, Favoreto S Jr, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A 2012 Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol.*;34(10):486-491. doi:10.1111/j.1365-3024.2012.01379.x
- Fagundes-Silva GA, Romero GAS, Cupolillo E, Yamashita EPG, Gomes-Silva A, Guerra JAO, Da-Cruz AM (2015). *Leishmania* (Viannia) naiffi: rare enough to be neglected? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* 110(6): 797-800.
- Falk K, Röttschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature.* 351(6324):290-6.

- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* (12):7853-9. doi: 10.1128/IAI.73.12.7853-7859.2005.
- Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO 2009. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31(8):432-9.
- Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EAF, Michalick MS, de Freitas E, Melo MN, Luiz Tafuri W, Resende Dde M, Hermont V, Abrantes Cde F, Gazzinelli RT 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine.*26: 5888–5895.
- Fernández L, Carrillo E, Sánchez-Sampedro L, Sánchez C, Ibarra-Meneses AV, Jimenez MA, Almeida VDA, Esteban M, Moreno J 2018. Antigenicity of *Leishmania*-Activated C-Kinase Antigen (LACK) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Protective Effect of Prime-Boost Vaccination With pCI-neo-LACK Plus Attenuated LACK-Expressing Vaccinia Viruses in Hamsters. *Front Immunol.* 9:843. doi: 10.3389/fimmu.2018.00843.
- Flower DR 2007. Immunoinformatics and the in silico prediction of immunogenicity. An introduction. *Methods Mol Biol.*409:1-15. doi:10.1007/978-1-60327-118-9_1
- Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC 2005. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 5(2), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.07.003>.
- Gene Ontology Consortium 2010. The Gene Ontology in 2010: extensions and refinements. *Nucleic Acids Res.*38(Database issue):D331-D335. doi:10.1093/nar/gkp1018.
- Galvão-Castro B, Ferreira JA, Marzochi KF 1984. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 56: 58-66.
- Giese V, Dallagiovanna B, Marchini F, Pavoni K, Daniela P, Krieger MA, Goldenberg S 2008. *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 103(6), 598-601.

- Global Health Technologies Fund 2016. Preclinical and preparation of early clinical testing of a new vaccine candidate against cutaneous leishmaniasis. Disponível em <https://www.ghitfund.org/investment/portfoliodetail/detail/113>.
- Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, Belli A, Favoreto Júnior S, Ferreira MS 2008. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(2):135-41. doi: 10.1590/s0037-86822008000200001.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM e Da-Cruz AM 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology.* 140(6):771-9.
- Goto Y, Bhatia A, Raman VS, Liang H, Mohamath R, Picone AF, Vidal SE, Vedvick TS, Howard RF, Reed SG 2011. KSAC, the first defined polyprotein vaccine candidate for visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* 18(7):1118-24. doi: 10.1128/CVI.05024-11.
- Gradoni L 2013. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: operational and research challenges. *Euro Surveill.* 18(30):20539. doi:10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20539.
- Greenbaum J, Sidney J, Chung J, Brander C, Peters B, Sette A 2011. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics.* 63(6):325-335. doi:10.1007/s00251-011-0513-0
- Guerfali FZ, Ben-Abdallah H, Sghaier RM, Ben-Aissa K, Mkannez G, Attia H, Laouini D 2009. 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.* 9(3):344-50.
- Gupta N, Garg S, VEDI S, Kunimoto DY, Kumar R, Agrawal B 2018. Future Path Toward TB Vaccine Development: Boosting BCG or Re-educating by a New Subunit Vaccine. *Front Immunol.*9:2371. doi:10.3389/fimmu.2018.02371.
- He Y, Rappuoli R, De Groot AS, Chen RT 2010. Emerging vaccine informatics. *J Biomed Biotechnol.*218590. doi:10.1155/2010/218590
- Heide J, Vaughan KC, Sette A, Jacobs T, Schulze Zur Wiesch J 2019. Comprehensive Review of Human *Plasmodium falciparum*-Specific CD8+ T Cell Epitopes. *Front Immunol.*10:397. doi:10.3389/fimmu.2019.00397

- Heinzel, FP, Rerko, RM, Ahmed F Pearlman E. 1995. Endogenous IL-12 is required for control of TH2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J Immunol* 155: 730-739.
- Herrera-Najera C, Piña-Aguilar R, Xacur-Garcia F, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E 2009. Mining the Leishmania genome for novel antigens and vaccine candidates. *Proteomics*. 9(5):1293-301.
- Higel L, Froehlich C, Pages MP, Dupont D, Collardeau-Frachon S, Dijoud F, Cochat P, Belot A 2015. Syndrome d'activation macrophagique et auto-immunité cortico-sensible révélateurs d'une leishmaniose viscérale [Macrophage activation syndrome and autoimmunity due to visceral leishmaniasis]. *Arch Pediatr*. 22(4):397-400.
- Huang FP, Xu D, Esfandiari EO, Sands W, Wei XQ, Liew FY 1998. Mice defective in Fas are highly susceptible to Leishmania major infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *J Immunol*.160(9):4143-4147.
- Huber M, Timms E, Mak TW, Röllinghoff M, Lohoff M 1998. Effective and long-lasting immunity against the parasite Leishmania major in CD8-deficient mice. *Infect Immun*. 66(8):3968-70.
- Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, Hernández-Plaza A, Forslund SK, Cook H, Mende DR, Letunic I, Rattei T, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res*. 47(D1):D309-D314. doi: 10.1093/nar/gky1085.
- Ip PP, Nijman HW, Daemen T 2015. Epitope Prediction Assays Combined with Validation Assays Strongly Narrows down Putative Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes. *Vaccines (Basel)*. 3(2):203-20.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Myler PJ 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. *Science* 309:436-442.
- Janin J, Wodak S 1978. Conformation of amino acid side-chains in proteins. *J Mol Biol*.;125(3):357-386. doi:10.1016/0022-2836(78)90408-4
- Janeway CA, Travers p, Walport M, Shlomchik M. *Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença*. 5a. ed. Porto Alegre: Artmed. 2002.

- Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P 2017. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.*45(W1):W24-W29. doi:10.1093/nar/gkx346.
- Jayakumar A, Castilho TM, Park E, Goldsmith-Pestana K, Blackwell JM, McMahon-Pratt D 2011. TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against *Leishmania (Viannia)*. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(6):e1204.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M 2002. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 5a. Ed. Porto Alegre. Art Med.
- Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, Sette A, Peters B, Nielsen M . 2018. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology.* 154(3):394-406. doi: 10.1111/imm.12889.
- Jianzhu Ma, Jian Peng, Sheng Wang, Jinbo Xu 2012. A conditional neural fields model for protein threading. *Bioinformatics.* 28(12): i59–i66.
- Juncker AS, Larsen MV, Weinhold N, Nielsen M, Brunak S, Lund O 2009. Systematic Characterisation of Cellular Localisation and Expression Profiles of Proteins Containing MHC Ligands. *PLoS ONE*, 4, e7448.
- Kaba SA, McCoy ME, Doll TAPF, Brando C, Guo Q, Dasgupta D, Yang Y, Mittelholzer C, Spaccapelo R, Crisanti A, Burkhard P, Lanar DE 2012. Protective Antibody and CD8+ T-Cell Responses to the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Induced by a Nanoparticle Vaccine. *PLOS ONE* 7(10): e48304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048304>.
- Kamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, Modabber F 2005. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine.* 23(28): doi: 10.1007/BF02809767.
- Kamhawi S, Oliveira F, Valenzuela JG 2014. Using humans to make a human leishmaniasis vaccine. *Sci Transl Med.*6(234):234fs18. doi:10.1126/scitranslmed.3009118
- Kaye P, Scott P 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 9(8):604-15.
- Kedzierska K, Curtis JM, Valkenburg SA, Hatton LA, Kiu H, Doherty PC, Kedzierski L 2012. Induction of protective CD4+ T cell-mediated immunity by a *Leishmania* peptide delivered in recombinant influenza viruses. *PLoS One.* 7(3):e33161.

- Kim A, Boronina TN, Cole RN, Darrah E, Sadegh-Nasseri S 2017. Distorted Immunodominance by Linker Sequences or Other Epitopes from a Second Protein Antigen during Antigen-Processing. *Sci. Rep.* 7, 46418. doi:10.1038/srep46418.
- Khan MA 2017. An Update on the Genetic Polymorphism of HLA-B*27 With 213 Alleles Encompassing 160 Subtypes (and Still Counting). *Curr Rheumatol Rep.*;19(2):9. doi:10.1007/s11926-017-0640-1
- Klein J, Satta Y, O'hUigin C, Takahata N 1993. The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol.*11:269-295. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001413.
- Kolaskar AS, Tongaonkar PC 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.*276(1-2):172-174. doi:10.1016/0014-5793(90)80535-q
- Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M 2012. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol*;8(12):e1002829. doi:10.1371/journal.pcbi.1002829.
- Kriventseva EV, Kuznetsov D, Tegenfeldt F, Manni M, Dias R, Simão FA, Zdobnov EM 2019. OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. *Nucleic Acids Res.*;47(D1):D807-D811. doi: 10.1093/nar/gky1053.
- Kurup SP, Tarleton RL 2014. The *Trypanosoma cruzi* flagellum is discarded via asymmetric cell division following invasion and provides early targets for protective CD8⁺ T cells. *Cell Host Microbe.*;16(4):439-449. doi:10.1016/j.chom.2014.09.003.
- Lainson R, Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killik-Kendrick (Rds), *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, Col 1, Academic Press, London, p.1-120.
- Llanos-Cuentas A, Calderón W, Cruz M, Ashman JA, Alves FP, Coler RN, Bogatzki LY, Bertholet S, Laughlin EM, Kahn SJ, Beckmann AM, Cowgill KD, Reed SG, Piazza FM 2010. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with sodium stibogluconate for the treatment of mucosal leishmaniasis. *Vaccine.* (46):7427-35. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.08.092. Epub 2010 Sep 17. PMID: 20851080.
- Larsen MV, Lundegaard C, Lamberth K, Buus S, Lund O, Nielsen M 2007. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics.* 8:424.
- Leow CY, Kazi A, Hisyam Ismail CMK, Chuah C, Lim BH, Leow CH, Banga Singh KK 2020. Reverse vaccinology approach for the identification and characterization of outer

- membrane proteins of *Shigella flexneri* as potential cellular- and antibody-dependent vaccine candidates. *Clin Exp Vaccine Res.* 9(1):15-25. doi: 10.7774/cevr.2020.9.1.15.
- Lesénéchal M, Becquart L, Lacoux X, Ladavière L, Baida RC, Paranhos-Baccalà G, da Silveira JF 2005. Mapping of B-cell epitopes in a *Trypanosoma cruzi* immunodominant antigen expressed in natural infections. *Clin Diagn Lab Immunol.*12(2):329-333.
- Leroux-Roels G, Van Hecke E, Michiels W, Voet P, Hauser P, Petre J 1994. Correlation between in vivo humoral and in vitro cellular immune responses following immunization with hepatitis B surface antigen (HBsAg) vaccines. *Vaccine.* 12:812–8.
- Liao WW, Arthur JW 2011. Predicting peptide binding to Major Histocompatibility Complex molecules. *Autoimmun Rev.* 10(8):469-73.
- Liew FY 1987. Regulation of cell-mediated immunity in cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.*;16 (3-4):321-327. doi:10.1016/0165-2478(87)90165-9
- Liu Z, Williams KP, Chang YH, Smith JA 1993. Immunodominance: A Single Amino Acid Substitution within an Antigenic Site Alters Intramolecular Selection of T Cell Determinants. *J. Immunol.* 151, 1852–1858.
- Llanes A, Restrepo CM, Del Vecchio G, Anguizola FJ, Leonart R 2015. The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the *L. (Viannia)* subgenus. *Sci Rep.* 5:8550. doi:10.1038/srep08550.
- Llanes A, Restrepo CM, Leonart R 2018. VianniaTopes: a database of predicted immunogenic peptides for *Leishmania (Viannia)* species. Database (Oxford). bay111. doi:10.1093/database/bay111.
- Lu J, Higashimoto Y, Appella E, Celis E 2004. Multiepitope Trojan antigen peptide vaccines for the induction of antitumor CTL and Th immune responses. *J Immunol.* 172(7):4575-82.
- Luo H, Ye H, Ng HW, Shi L, Tong W, Mendrick DL, Hong H 2015. Machine Learning Methods for Predicting HLA-Peptide Binding Activity. *Bioinform Biol Insights.* 9 (Suppl 3):21-9.
- Maacho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H 1998. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun* 66: 2698-2704.
- Maccari G, Robinson J, Ballingall K, Guethlein LA, Grimholt U, Kaufman J, Ho CS, de Groot NG, Flicek P, Bontrop RE, Hammond JA, Marsh SG 2017. IPD-MHC 2.0: an improved inter-species database for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res.* 45(D1):D860-D864. doi: 10.1093/nar/gkw1050.

- Maga JA, Sherwin T, Francis S, Gull K, LeBowitz JH 1999. Genetic dissection of the *Leishmania* paraflagellar rod, a unique flagellar cytoskeleton structure. *J Cell Sci*;112:2753-2763.
- Magalhães, RD, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Menezes-Souza D, Régis WC, Manso Alves MJ, Soto M, Tavares CA, Nagen R. A, Coelho EA 2014. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLoS neglected tropical diseases*. 8(4), e2764. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002764>
- Maharana BR, Sudhakar NR, Jawalagatti V, Saravanan BC, Blake DP, Tewari AK 2020. Evaluation of the Immunoprotective Potential of Recombinant Paraflagellar Rod Proteins of *Trypanosoma evansi* in Mice. *Vaccines (Basel)*. 8(1):84. doi:10.3390/vaccines8010084
- Mahmoudzadeh-Niknam H, McKerrow JH 2004. *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp Parasitol*.106 (3–4):158–63.
- Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, Wolfe I, Ceesay SJ, DeGrootte D, Corrah T, Bennett S, Wheeler J, Huygen K, Aaby P, McAdam KPWJ 1999. Newborns Develop a Th1-Type Immune Response to *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Vaccination. *The Journal of Immunology*. 163(4): 2249-2255.
- Marzochi MC, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza WJS 1980. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar Americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro): Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. *Ver Inst Med Trop São Paulo*. 22: 149-155.
- Marzochi KB, Marzochi MA, Silva AF, Grativol N, Duarte R, Confort EM, Modabber F 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 93(2):205-12. doi: 10.1590/s0074-02761998000200014.
- Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, Michalick MS, Williams P 1979. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.73(4):385-7. doi: 10.1016/0035-9203(79)90159-7.
- McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA 1983. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *The New England Journal of Medicine*. 309(1): doi: 10.1056/nejm198307073090103.

- Méndez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Skeiky YA, Campos-Neto A, Reed S, Seder RA, Sacks D 2001. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol.*166 (8):5122-8. doi: 10.4049/jimmunol.166.8.5122.
- Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y 2004. Role for CD4 (+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med.* 200(2):201-210. doi:10.1084/jem.20040298
- Moafi M, Rezvan H, Sherkat R e Taleban R 2019. *Leishmania* vaccines entered in clinical trials: A review of literature. *Int J Prev Med*;10:95. doi:10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18.
- Mohajery, M., Shamsian, A., and Mahmoodi, M. 2007. Tc1 Cells percentage in patients with cutaneous leishmaniasis before and after treatment with Glucantime. *Iran. J. Public Health* 36, 55–61.
- Moore LL, Santrich C, LeBowitz JH 1996. Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2. *Mol Biochem Parasitol.*80 (2):125-135.
- Montalvão F, Nascimento DO, Nunes MP, Koeller CM, Morrot A, Lery LMS, Bisch PM, Teixeira SMR, Vasconcelos R, Freire-de-Lima L, Lopes MF, Heise N, DosReis GA, Freire-de-Lima CG 2018. Antibody Repertoires Identify β -Tubulin as a Host Protective Parasite Antigen in Mice Infected With *Trypanosoma cruzi*. *Front Immunol.*9:671.
- Morgado FN, Schubach A, Rosalino CM, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, Conceição-Silva F 2008. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol.* 2008 Jan;158 (1):50-8. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08255.x.
- Moss DL, Park HW, Mettu RR, Landry SJ 2019. Deimmunizing Substitutions in *Pseudomonas* Exotoxin Domain III Perturb Antigen Processing without Eliminating T-Cell Epitopes. *J. Biol. Chem.* 294: 4667–4681.
- Mottram JC, Souza AE, Hutchison JE, Carter R, Frame MJ, Coombs GH 1996. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *93(12):6008-6013.* doi:10.1073/pnas.93.12.6008
- Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD 1992. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol.* 6(14):1925-32.
- Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE, Souza AE, Coombs GH 1997. The multiple *cpb* cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J Biol Chem.* 272(22):14285-93.

- Mottram JC, Coombs GH, Alexander J 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol*. 7(4):375–81.
- Müller I 1992. Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to *Leishmania major*. *Eur J Immunol*. 22(12):3063-9.
- Múnera M, Farak J, Pérez M, Rojas J, Villero J, Sánchez A, Sánchez J, Emiliani Y 2020. Prediction of molecular mimicry between antigens from *Leishmania* sp. and human: Implications for autoimmune response in systemic erythematous lupus. *Microb Pathog*. 2020;104444. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104444. Epub ahead of print. PMID: 32827635.
- Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G, Coffman RL 2002. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun*. 70(11):6284-93. doi: 10.1128/iai.70.11.6284-6293.2002.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.
- Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M 1983. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 76(4):377-383.
- Naiff RD, Talhari S, Barret TV 1988. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 529-530.
- Nascimento E, Fernandes DF, Vieira EP, Campos-Neto A, Ashman JA, Alves FP, Coler RN, Bogatzki LY, Kahn SJ, Beckmann AM, Pine SO, Cowgill KD, Reed SG, Piazza FM 2010. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 28(40):6581-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.07.063.
- Naouar I, Bousoffara T, Chenik M, Gritli S, Ben Ahmed M, Belhadj Hmida N, Bahi-Jaber N, Bardi R, Gorgi Y, Ben Salah A, Louzir H 2016. Prediction of T Cell Epitopes from *Leishmania major* Potentially Excreted/Secreted Proteins Inducing Granzyme B Production. *PLoS One*. 11(1):e0147076.
- Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, Smith PG, Moulton LH, Nasser K, Sharifi I, Khalil EA, Bernal ID, Antunes CM, Kieny MP, Tanner M 2008. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine*. 26(52):6759-67.

- Noormehr H, Zavarán Hosseini A, Souidi S, Beyzay F 2018. Enhancement of Th1 immune response against Leishmania cysteine peptidase A, B by PLGA nanoparticle. *Int Immunopharmacol.* 59:97-105.
- Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, Betts MR, Goldschmidt MH, Wilson ME, de Oliveira CI, Scott P 2013. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog.* 9(7):e1003504.
- Ohno S, Emori Y, Suzuki K. Nucleotide sequence of a cDNA coding for the small subunit of human calcium-dependent protease. *Nucleic Acids Res.* 1986;14(13):5559.
- Okwor IB, Jia P, Mou Z, Onyilagha C, Uzonna JE 2014. CD8+ T cells are preferentially activated during primary low dose leishmania major infection but are completely dispensable during secondary anti-Leishmania immunity. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(11):e3300. Published Nov 20. doi:10.1371/journal.pntd.0003300
- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza SC, Fernandez O, Pirmez C 1998. Leishmaniasis recidiva cútis in New World cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 37:846-849.
- Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandez O, Moreira J, Gonçalves-Costa SC, Brahin LR, Menezes CR, Pirmez C. 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro state, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J. Dermatology* 39: 506-514.
- Paape D, Aebischer T 2011. Contribution of proteomics of Leishmania spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. *J Proteomics.* 74(9):1614-24.
- Parker JM, Guo D, Hodges RS 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry.*;25 (19):5425-5432. doi:10.1021/bi00367a013
- Partridge E, Lujan E, Giuntini S, Vu DM, Granoff DM 2017. The role of anti-NHba antibody in bactericidal activity elicited by the meningococcal serogroup B vaccine, MenB-4C. *Vaccine.* 35(33):4236-4244. doi:10.1016/j.vaccine.2017.06.020.
- Patronov A, Doytchinova I 2013. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol.* 3(1):120139. doi:10.1098/rsob.120139
- Peacock C.S., Seeger K., Harris D., Murphy L., Ruiz J.C., Quail M.A., Peters N., Adlem E., Tivey A., Aslett M., Kerhornou A., Ivens A., Fraser A., Rajandream M.-A., Carver T., Norbertczak H., Chillingworth T., Hance Z. Jagels K., Moule S., Ormond D., Rutter S.,

- Sqaures R., Whitehead S., Rabbinowitsch E., Arrowsmith C., White B., Thurston S., Bringaud F., Baldauf S.L., Faulconbridge A., Jeffares D., Depledge D.P., Oyola S.O., Hilley J.D., Brito L.O., Tosi L.R.O., Barrell B., Cruz A.K., Mottram J.C., Smith D.F., Berriman M 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 39(7):839-847. doi:10.1038/ng2053
- Pellequer JL, Westhof E, Van Regenmortel MH 1991. Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. *Methods Enzymol* 203:176-201.
- Pellequer JL, Westhof E, Van Regenmortel MH 1993. Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins. *Immunol Lett.*36(1):83-99. doi:10.1016/0165-2478(93)90072-a.
- Pessoa SB, Pestana BR 1940. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germans mortos. *Ver. Biol. Hig;* 10:112-118.
- Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JR, Guedes HL, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B 2005. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect.* 7(13):1317-1323. doi:10.1016/j.micinf.2005.04.016.
- Pinho N, Wiśniewski JR, Dias-Lopes G, Saboia-Vahia L, Bombaça ACS, Mesquita-Rodrigues C, Menna-Barreto R, Cupolillo E, de Jesus JB, Padrón G, Cuervo P 2020. In-depth quantitative proteomics uncovers specie-specific metabolic programs in *Leishmania* (Viannia) species. *PLoS Negl Trop Dis.*14(8): e0008509. doi: 10.1371/journal.pntd.0008509. PMID: 32804927;
- Pinto EF, Cortezia MM, Rossi-Bergmann B 2003. Interferon-gamma – inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 21: 3534-3541.
- Pinto EF, Pinheiro RO, Rayol A, Larraga V, Rossi-Bergmann B 2004. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis using a particulated leishmanial antigen or LACK-DNA. *Infect Immun.* 72:4521-7.
- Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, Peters B 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics.* 9:514. doi: 10.1186/1471-2105-9-514.
- Pratti JE, Ramos TD, Pereira JC, da Fonseca-Martins AM, Maciel-Oliveira D, Oliveira-Silva G, de Mello MF, Chaves SP, Gomes DC, Diaz BL, Rossi-Bergmann B, de Matos Guedes HL. 2016 et al. Efficacy of intranasal LaAg vaccine against *Leishmania*

- amazonensis infection in partially resistant C57Bl/6 mice. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):534. doi:10.1186/s13071-016-1822-9.
- Quijada L, Requena JM, Soto M, Alonso C. 1996. During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-HSP70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology*. 112 (Pt3):277-284.
- Rafati S, Salmanian AH, Hashemi K, Schaff C, Belli S, Fasel N 2001. Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. *Mol Biochem Parasitol* 113(1):35-43.
- Rafati S, Nakhaee A, Taheri T, Taslimi Y, Darabi H, Eravani D, Sanos S, Kaye P, Taghikhani M, Jamshidi S, Rad MA 2005. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine*. 23(28):3716-25.
- Rafati S, Zahedifard F, Nazgouee F 2006. Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 24(12):2169-75.
- Raju S, Rao V. 2010. Current development strategies for vaccines and the role of reverse vaccinology. *J. Pharm. Res. Health Care*. 2: 339–346. 10.18311/ajprhc/2010/584.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 50(3-4):213-9.
- Raymond F, Boisvert S, Roy G, Ritt JF, Légaré D, Isnard A, Stanke M, Olivier M, Tremblay MJ, Papadopoulou B, Ouellette M, Corbeil J 2012. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res*. 40(3):1131-47.
- Ravn P, Boesen H, Pedersen BK, Andersen P 1997. Human T cell responses induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *The Journal of Immunology*. 158 (4) 1949-1955.
- Ready PD 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin. Epidemiol*. 6, 147– 154.
- Reche PA, Reinherz EL 2007. Definition of MHC supertypes through clustering of MHC peptide-binding repertoires. *Methods Mol Biol*. 409:163-73.
- Reed SG, Badaro R, Lloyd RM 1987.. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani* chagasi by human infection sera. *The Journal of Immunology*. 138(5) 1596-1601;
- Reineke U, Schutkowski M 2009. Epitope mapping protocols. Preface. *Methods Mol Biol*.524:v-vi.

- Rekstin A, Isakova-Sivak I, Petukhova G, Korenkov D, Losev I, Smolonogina T, Tretiak T, Donina S, Shcherbik S, Bousse T, Rudenko L ;2017. Immunogenicity and Cross Protection in Mice Afforded by Pandemic H1N1 Live Attenuated Influenza Vaccine Containing Wild-Type Nucleoprotein. *Biomed Res Int.* 9359276. doi: 10.1155/2017/9359276.
- Resende DM, Rezende AM, Oliveira NJ, Batista IC, Corrêa-Oliveira R, Reis AB, Ruiz JC 2012. An assessment on epitope prediction methods for protozoa genomes. *BMC Bioinformatics.* 13:309.
- Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Filkestein LC, Gomes- Silva A, Galvão J.V, Pirmez C, Cruz AM, Pinto EF 2014. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different concentrations of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Infect Immun.* 82: 5203 – 5213.
- Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, Cruz AM, Pinto EF e Moreira OC 2016. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasites & Vectors.* 9. 361
- Rinaudo CD, Telford JL, Rappuoli R, Seib KL 2009. Vaccinology in the genome era. *J Clin Invest.* 119(9):2515-25.
- Rivero-Calle I, Raguindin PF, Gómez-Rial J, Rodriguez-Tenreiro C, Martínón-Torres F 2019. Meningococcal Group B Vaccine For The Prevention Of Invasive Meningococcal Disease Caused By *Neisseria meningitidis* Serogroup B. *Infect Drug Resist.* 12:3169-3188.
- Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE 2020. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res.*48 (D1):D948-D955. doi:10.1093/nar/gkz950
- Rodriguez-Contreras D, Hamilton N 2014. Gluconeogenesis in *Leishmania mexicana*: contribution of glycerol kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and pyruvate phosphate dikinase. *J Biol Chem.* 289(47):32989-33000.
- Rodrigues IA, Mazotto AM, Cardoso V, Alves RL, Amaral AC, Silva JR, Pinheiro AS, Vermelho AB 2015. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. *Mediators Inflamm.*835910. doi: 10.1155/2015/835910.
- Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC 2011. Chromosome and gene copy number variation

- allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res.* 21:2129-2142.
- Romano A, Doria NA, Mendez J, Sacks DL, Peters NC 2015. Cutaneous Infection with *Leishmania major* Mediates Heterologous Protection against Visceral Infection with *Leishmania infantum*. *J Immunol.* 195(8):3816-27.
- Rost B 1999. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.*;12 (2):85-94. doi:10.1093/protein/12.2.85.
- Rostamian M, Akya A, Niknam HM 2019. Heterogeneity of humoral immune response to *Leishmania tropica* in an experimental model. *Parasitol Res.* 118(4):1231-1237. doi:10.1007/s00436-019-06256-3.
- Saha S, Bhasin M, Raghava GP 2005. Bcipep: a database of B-cell epitopes. *BMC Genomics.* 5:6:79. doi:10.1186/1471-2164-6-79.
- Saha S, Raghava GP 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins.*;65 (1):40-48. doi:10.1002/prot.21078.
- Saljoughian N, Zahedifard F, Doroud D, Doustdari F, Vasei M, Papadopoulou B, Rafati S. Cationic solid-lipid nanoparticles are as efficient as electroporation in DNA vaccination against visceral leishmaniasis in mice. *Parasite Immunol.* 2013 Dec;35(12):397-408. doi: 10.1111/pim.12042.
- Salotra P, Raina A, Negi NS 1999. Immunoblot analysis of the antibody response to antigens of *Leishmania donovani* in Indian kala-azar. *Br J Biomed Sci.*;56(4):263-267.
- Santos CDAS, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI 2013. CD8 (+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)/IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous.
- Santos, LMG, Hiro, G, Shaw, JJ 1999. Vacina contra Leishmaniose cutânea. *Imunizações,* v2, n2, p44-51.
- Saravia NG, Hazbón MH, Osorio Y, Valderrama L, Walker J, Santrich C, Cortázar T, Lebowitz JH, Travi BL 2005. Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. *Vaccine.* 23(8):984-95. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.07.044.
- Saravia NG, Escorcía B, Osorio Y, Valderrama L, Brooks D, Arteaga L, Coombs G, Mottram J, Travi BL 2006. Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. *Vaccine.*24 (19):4247-4259.

- Saxena A, Lahav T, Holland N, Aggarwal G, Anupama A, Huang Y, Volpin H, Myler P, Zilberstein D 2007. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 152:53–65.
- Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM 2008. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 21(5):483-488. doi:10.1097/QCO.0b013e32830d0ee8
- Seder RA, Hill AV 2000. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 406: 793-798.
- Seib KL, Dougan G, Rappuoli R 2009. The key role of genomics in modern vaccine and drug design for emerging infectious diseases. *PLoS Genet.* (10):e1000612.
- Sélo I, Clément G, Bernard H, Chatel J, Créminon C, Peltre G, Wal J 1999. Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin Exp Allergy.* 29(8):1055-63. doi: 10.1046/j.1365-2222.1999.00612.x.
- Selvapandiyan A, Dey R, Nylen S, Duncan R, Sacks D, Nakhasi HL 2009. Intracellular replication-deficient *Leishmania donovani* induces long lasting protective immunity against visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 183 (3):1813-1820. doi:10.4049/jimmunol.0900276
- Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudgil K 1993. Dominance and Crypticity of T Cell Antigenic Determinants. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 729–766.
- Sette A, Newman M, Livingston B, McKinney D, Sidney J, Ishioka G, Tangri S, Alexander J, Fikes J, Chesnut R 2002. Optimizing vaccine design for cellular processing, MHC binding and TCR recognition. *Tissue Antigens.* 59(6):443-51.
- Seyed N, Taheri T, Vauchy C, Dosset M, Godet Y, Eslamifar A, Sharifi I, Adotevi O, Borg C, Rohrlach PS, Rafati S 2014. Immunogenicity evaluation of a rationally designed polytope construct encoding HLA-A*0201 restricted epitopes derived from *Leishmania* major related proteins in HLA-A2/DR1 transgenic mice: steps toward polytope vaccine. *PLoS One.* 9(10):e108848. doi: 10.1371/journal.pone.0108848.
- Seyed N, Taheri T, Rafati S 2016. Post-Genomics and Vaccine Improvement for *Leishmania*. *Front Microbiol.*; 7:467. doi:10.3389/fmicb.2016.00467
- Shin MD., Shukla S, Chung YH, Beiss V, Chan SK, Ortega-Rivera OA, Wirth DM, Chen A, Sack M, Pokorski JK, Steinmetz NF 2020. COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. *Nature Nanotechnol.* 15: 646-655.

- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 99(3), 239–251. doi: 10.1590/s0074-02762004000300001.
- Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE 2008. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 102: 1075-1080.
- Silvestre R, Cordeiro-da-Silva A, Ouaisi A 2008. Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 56(2):123-6.
- Singh S, Kumari V, Singh N, 2002. Predicting Kala-Azar Disease Manifestations in Asymptomatic Patients with Latent *Leishmania donovani* Infection by Detection of Antibody against Recombinant K39 Antigen. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 568–572.
- Singh RK, Srivastava A, Singh N 2012. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiol Res.*167(8):445-451. doi:10.1016/j.micres.2012.01.002
- Singh SP, Roopendra K, Mishra BN 2015. Genome-Wide Prediction of Vaccine Candidates for *Leishmania major*: An Integrated Approach. *J Trop Med.* 2015:709216. doi:10.1155/2015/709216.
- Siqueira-Neto JL, Debnath A, McCall LI, Bernatchez JA, Ndao M, Reed SL, Rosenthal PJ 2018. Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS neglected tropical diseases.*12 (8), e0006512. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512>
- Skeiky YA, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, Crane RT, Webb JR, Campos-Neto A, Reed SG 2002. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine.* 20(27-28):3292-303.
- Slingluff CL Jr 2011. The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? *Cancer J.* 17(5):343-50.
- Souza AE, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC 1992. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett.* 311(2):124-7.
- Späth GF, Lye LF, Segawa H, Turco SJ, Beverley SM 2004. Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of *Leishmania major* able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to

- virulence and immunization strategies. *Infect Immun.* 72 (6):3622-3627. doi:10.1128/IAI.72.6.3622-3627.2004
- Stranzl T, Larsen MV, Lundegaard C, Nielsen M 2010. NetCTLpan - Pan-specific MHC class I epitope predictions. *Immunogenetics.* 62(6):357-368. doi:10.1007/s00251-010-0441-4
- Tang ST, van Meijgaarden KE, Caccamo N, Guggino G,G, Klein MR, van Weeren P, Kazi F, Stryhn A, Zaigler A, Sahin U, Buus S, Dieli F, Lund O, Ottenhoff TH 2011. Genome-based in silico identification of new Mycobacterium tuberculosis antigens activating polyfunctional CD8+ T cells in human tuberculosis. *J Immunol.* 186(2):1068-80.
- Tanner R, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, McShane H 2019. The Humoral Immune Response to BCG Vaccination. *Front Immunol.* 10:1317. doi:10.3389/fimmu.2019.01317.
- Thakur A, Heidi Mikkelsen H, Jungersen G 2019. Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies. *Journal of Immunology Research.* 2019:1356540. doi:10.1155/2019/1356540
- Toepp A, Larson M, Wilson G, Grinnage-Pulley T, Bennett C, Leal-Lima A, Anderson B, Parrish M, Anderson M, Fowler H, Hinman J, Kontowicz E, Jefferies J, Beeman M, Buch J, Saucier J, Tyrrell P, Gharpure R, Cotter C, Petersen C 2018. Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess Leishmania vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniasis. *Vaccine.* 36(43):6433-6441. doi:10.1016/j.vaccine.2018.08.087
- Tomar N, De RK 2010. Immunoinformatics: an integrated scenario. *Immunology.* 131(2):153-68.
- Tran NH, Qiao R, Xin L, Liu C, Zhang X, Shan B, Ghodsi A, Li M 2019. Deep learning enables de novo peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry. *Nat Methods.* 16: 63–66. doi: 10.1038/s41592-018-0260-3.
- Trowsdale J, Knight JC 2013. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 14:301-323. doi:10.1146/annurev-genom-091212-153455.
- Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E 2003. CD8 (+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.;* 25(11-12):569-579. doi:10.1111/j.0141-9838.2004.00672.x.

- Tsimberidou AM 2015. Targeted therapy in cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.*;76 (6):1113-1132. doi:10.1007/s00280-015-2861-1
- Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MI, Neto VA, Amato VS 2008. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin Immunol.* 128(3):442-6.
- Tyanova S, Temu T, Cox J 2016. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc.* 11: 2301–2319 doi:10.1038/nprot.2016.136
- Uzonna JE, Joyce KL, Scott P 2004. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med.*;199(11):1559-1566. doi:10.1084/jem.20040172
- Van Regenmortel MH, Altschuh D, Zeder-Lutz G 1993. Tobacco mosaic virus: a model antigen to study virus-antibody interactions. *Biochimie.*75(8):731-739. doi:10.1016/0300-9084(93)90104-z.
- Van Regenmortel MH 2006. Immunoinformatics may lead to a reappraisal of the nature of B cell epitopes and of the feasibility of synthetic peptide vaccines. *J Mol Recognit.*;19(3):183-187. doi:10.1002/jmr.768
- Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L 2008. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. *J Immunol.* 180(11):7537-45.
- Vélez ID, Gilchrist K, Arbelaez MP, Rojas CA, Puerta JA, Antunes CM, Zicker F, Modabber F 2005. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg;* 99(8):593-598.
- Vexenat Ade C, Santana JM, Teixeira AR 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 38(3):177-185. doi:10.1590/s0036-46651996000300003.
- Vihinen M, Torkkila E, Riikonen P 1994. Accuracy of protein flexibility predictions. *Proteins.*19 (2):141-149. doi:10.1002/prot.340190207.
- Vita R, Overton JA, Mungall CJ, Sette A, Peters B 2018. FAIR principles and the IEDB: short-term improvements and a long-term vision of OBO-foundry mediated machine-actionable interoperability. *Database (Oxford):bax105.* doi:10.1093/database/bax105

- Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, Wheeler DK, Sette A, Peters B 2019. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 47(D1):D339-D343. doi:10.1093/nar/gky1006
- Yu K, Petrovsky N, Schönbach C, Koh JY, Brusic V 2002. Methods for prediction of peptide binding to MHC molecules: a comparative study. *Mol Med.* 8(3):137-48.
- Wallace GR, Ball AE, MacFarlane J, el Safi SH, Miles MA Kelly JM 1992. Mapping of a visceral leishmaniasis-specific immunodominant B-CELL epitope of *Leishmania donovani* Hsp70. *Infection and immunity.* 60 (7), 2688-2693.
- Wang ZE, Reiner SL, Hatam F, Heinzl FP, Bouvier J, Turck CW, Locksley RM 1993. Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol.* 151(4):2077-86.
- Wang SX, Xu YP, Zhang H 2016. Genomic full-length sequence of two HLA-A alleles, A*23:01:01 and A*24:02:01:01, identified by cloning and sequencing. *HLA.*87(1):43-45. doi:10.1111/tan.12709.
- Webb JR, Campos-Neto A, Owendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG 1998. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun.* 66(7):3279-89.
- Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: environmental and behavioral risk factors for infection, clinical manifestations, and pathogenicity. *J Infect Dis.* 1993;168(3):709-714. doi:10.1093/infdis/168.3.709
- Welsch JÁ, Moe GR, Rossi R Adu-Bobie J, Rappuoli R, Granoff DM 2003. Antibody to genome-derived neisserial antigen 2132, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine, confers protection against bacteremia in the absence of complement-mediated bactericidal activity. *J Infect Dis.* 188(11):1730-1740. doi:10.1086/379375
- Weaver JM; Lazarski CA, Richards KA, Chaves FA; Jenks SA, Menges PR, Sant AJ 2008. Immunodominance of CD4 T Cells to Foreign Antigens Is Peptide Intrinsic and Independent of Molecular Context: Implications for Vaccine Design. *J. Immunol.* 181: 3039–3048.
- Williams RA, Mottram JC, Coombs GH 2013. Distinct roles in autophagy and importance in infectivity of the two ATG4 cysteine peptidases of *Leishmania major*. *J Biol Chem.* 288(5):3678–90. doi:10.1074/jbc.M112.415372.

- Wilson C, Tiwana H, Ebringer A. Molecular mimicry between HLA-DR alleles associated with rheumatoid arthritis and *Proteus mirabilis* as the Aetiological basis for autoimmunity 2000. *Microbes Infect.* 2(12):1489-1496. doi:10.1016/s1286-4579(00)01303-4
- Wolfram M, Fuchs M, Wiese M, Stierhof YD, Overath P 1996. Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells by a model parasite antigen secreted into the parasitophorous vacuole or expressed on the amastigote surface. *Eur J Immunol.*26(12):3153-3162. doi:10.1002/eji.1830261248.
- Wooller SK, Benstead-Hume G, Chen X, Ali Y, Pearl FMG 2017. Bioinformatics in translational drug discovery. *Biosci Rep.*37(4):BSR20160180. Published 2017 Jul 7. doi:10.1042/BSR20160180
- World Health Organization (WHO) 2004. Disease watch focus: leishmaniasis. Disponível em https://www.who.int/tdr/publications/disease_watch/leish/en/
- World Health Organization (WHO). 2019a. Leishmaniasis: epidemiological Report of the Americas. Disponível em https://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_paho_era7/en
- World Health Organization (WHO) 2019b. Visceral leishmaniasis elimination: Intensifying surveillance to overcome last-mile challenges in Nepal. Disponível em https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1.
- Zahedifard F, Gholami E, Taheri T, Taslimi Y, Doustdari F, Seyed N, Torkashvand F, Meneses C, Papadopoulou B, Kamhawi S, Valenzuela JG, Rafati S 2014. Enhanced protective efficacy of nonpathogenic recombinant *leishmania tarentolae* expressing cysteine proteinases combined with a sand fly salivary antigen. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(3):e2751.
- Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.*;18 (6):272-278. doi:10.1016/s1471-4922(02)02289-4.
- Zhang M, Dong C, Xiong S 2017. Vesicular Stomatitis Virus-Vectored Multi-Antigen Tuberculosis Vaccine Limits Bacterial Proliferation in Mice following a Single Intranasal Dose. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:34. doi:10.3389/fcimb.2017.00034.
- Zhang WW, Karmakar S, Gannavaram S, Dey R, Lypaczewski P, Ismail N, Siddiqui A, Simonyan V, Oliveira F, Coutinho-Abreu IV, DeSouza-Vieira T, Meneses C, Oristian J, Serafim TD, Musa A, Nakamura R, Saljoughian N, Volpedo G, Satoskar M, Satoskar S, Dagur PK, McCoy JP, Kamhawi S, Valenzuela JG, Hamano S, Satoskar AR,

Matlashewski G, Nakhasi HL 2020. A second generation leishmanization vaccine with a markerless attenuated *Leishmania major* strain using CRISPR gene editing. *Nat Commun.* 11(1):3461. doi: 10.1038/s41467-020-17154-z.

Zuttshi S, Kumar S, Chauhan P, BBansode Y, Nair A, Roy S, Sarkar A, Saha B 2019. Anti-Leishmanial Vaccines, Approaches, and Annulments. *Vaccines (Basel).* 7(4): 156. doi:10.3390/vaccines7040156.

ANEXOS

ANEXO 1

Predição de epítomos lineares e não lineares de proteínas quantificadas em LaAg(s) ou em LnAg(s), reconhecidos por linfócitos B.

Descrição grupo proteico	ID Uniprot	PDB	Preditores de epítomos lineares*	Preditores de epítomos não lineares**	Número de epítomos lineares (Preditor ABC Pred)
Circumsporozoite protein (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Q5R2L8	1LSL	1,2,3,4	5,6	42
HBsAg (Vírus da Hepatite B)	Q81158	4NKH	1,2,3,4	5,6	20
<i>Acyltransferase/mycolyltransferase Ag85A (Mycobacterium bovis)</i>	P0C2T1 (A85A_MY CBO)	1SFR	1,2,3,4	5,6	27
Acetylornithine deacetylase-like protein	E9AL37	1YC9	1,2,3,4	5,6	40
IU_nuc_hydro	E9ALE	5CW	1,2,3,4	5,6	30

domain-containing protein	4	N			
Guanine deaminase	E9ALY 9	NM	1,2,3,4	5,6	
Oligopeptidase b	E9AMS 8	NM	1,3,4	5,6	53
Elongation factor-1 gamma	E9AMU 9	1BG5	1,2,3,4	5,6	43
Uncharacterized protein	E9AMV 3	3ERR	1,2,3,4	5,6	63
Leishmanolysin	E9AN5 7	4GN8	1,3,4	5,6	60
Uncharacterized protein	E9AND 9	4DIN	1,2,3,4	5,6	30
Putative carboxypeptidase (Metallo-peptidase, clan ma(E), family 32)	E9AP4 3	3DW C	1,2,3,4	5,6	52
Nucleoside hydrolase-like protein	E9APK 7	3IFE	1,2,3,4	5,6	34
Putative immunodominant antigen (Tc40 antigen-like)	E9APT 8	5CW K	1,2,3,4	5,6	84
C2 domain-containing protein	E9APZ 2	2YFA	1,2,3,4	5,6	97
Putative peptidase t (Peptidase t, putative, metallo-peptidase, clanmh, family m20b)	E9AQY 9	3FZ0	1,2,3,4	5,6	40
RING-type domain-containing protein	E9ARQ 2	3PAO	1,3,4	5,6	38
Uncharacterized protein	E9ATG 0	3D01	1,2,3,4	5,6	31

Uncharacterized protein	E9AVQ 7	3PFO	1,2,3,4	5,6	41
Putative endoribonuclease L-PSP (Pb5)	E9AW2 1	4L6Y	1,2,3,4	5,6	19
Uncharacterized protein	E9AYH 6	2M64	1,2,3,4	5,6	86
SGL domain-containing protein	E9AZU 2	1LML	1,2,3,4	5,6	44
Glutamate dehydrogenase	E9B0B 3	2BMA	1,2,3,4	5,6	49
Uncharacterized protein	E9B2B 1	4I70	1,2,3	5,6	88
Regulatory subunit of protein kinase a-like protein	E9B573	2XE4	1,2,3,4	5,6	57
Uncharacterized protein	E9B5S 3	1L7D	1,2,3,4	5,6	59
Adenine aminohydrolase	E9B695	4A49	1,2,3,4	5,6	34
Uncharacterized protein	E9BBK 0	5CW P	1,2,3,4	5,6	84
Glycoprotein 96-92, putative	E9BJV 8	1GV M	1,2,3,4	5,6	39
Uncharacterized protein	E9BKD 4	4J6C	1,2,3,4	5,6	31
Membrane-bound acid phosphatase	Q25327	NM	1,2,3	5	48
Uncharacterized protein	A0A088 RNC4	1H3I	1,2,3,4	5,6	32
Putative carboxypeptidase	A4H71 6	3DW C	1,2,3,4	5,6	51
Putative peptidase t	A4H8W	3 IFE	1,2,3,4	5,6	43

	3				
Uncharacterized protein	A4HA65	1NFJ	1,2,3,4	6	33
Agmatinase-like protein	A4HCM0	NM	1,2,3,4	5,6	34
Putative asparagine synthetase a	A4HET8	2GHP	1,2,3,4	5,6	36
Uncharacterized protein	A4HIG5	NM	1,2,3,4	5,6	37
<i>Putative calpain-like cysteine peptidase</i>	E9AYV2	5HDT	1,2,3,4	5,6	68
<i>Uncharacterized protein</i>	A0A1E1J931	2XOX	1,2,3	6	84
<i>Uncharacterized protein</i>	A4H5I7	5CW P	1,2,3	5	51
<i>Putative NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase</i>	A4H6Z3	1JQO	1,2,3,4	5,6	36
<i>Putative kinesin K39 (Fragment)</i>	A4H7T4	NM	1,2,3,4	5,6	98
<i>Uncharacterized protein</i>	A4H8U7	1QXP	1,2,3,4	5,6	81
<i>Putative translation initiation factor</i>	A4H988	6F6P	1,2,3,4	5,6	70
<i>Putative mitochondrial RNA binding protein</i>	A4HCU6	3SQZ	1,2,3	5	32
<i>Putative fumarate hydratase</i>	A4HHJ6	NM	1,2,3,4	5,6	56
<i>Paraflagellar rod protein 1D</i>	A4HIY0	5WQ3	1,2,3,4	5,6	56
<i>Putative carboxypeptidase</i>	A4HLW4	4PZL	1,2,3,4	5,6	48

<i>Uncharacterized protein</i>	E8NHG 6	4PEQ	1,2,3,4	5,6	73
<i>LmxM_30_0440_1</i>					
<i>WGS CADB000000000 data, contig 50 (Fragment)</i>	E8NHK 3	2POZ	1,2,3,4	5,6	82
<i>WGS CADB000000000 data, contig 73</i>	E8NHP 1	NM	1,3,4	5,6	76
<i>FYVE-type domain-containing protein</i>	E9AJR 2	2VDA	1,2,3,4	5,6	133
<i>Uncharacterized protein</i>	E9ANN 3	1ST6	1,2,3,4	5,6	100
<i>Thioredoxin-like_fold domain-containing protein</i>	E9APL 2	NM	1,2,3,4	5,6	22
<i>Uncharacterized protein</i>	E9AQ0 1	4U1D	1,2,3,4	5,6	34
<i>Uncharacterized protein</i>	E9AQY 8	NM	1,2,3,4	5,6	81
<i>Putative heat shock protein</i>	E9ARS 1	5L2R	1,2,3,4	5,6	80
<i>Uncharacterized protein</i>	E9AS6 7	2YWI	1,2,3,4	5,6	39
<i>Uncharacterized protein</i>	E9ATV 9	NM	1,2,3,4	5,6	351
<i>Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8</i>	E9AUD 5	NM	1,2,3,4	5,6	70
<i>Pteridine reductase 1</i>	E9AW3 0	2CQI	1,2,3,4	5,6	30
<i>HMG_CoA_synt_N domain-containing protein</i>	E9AX5 7	3V6I	1,2,3,4	5,6	50

<i>HpcH_Hpal domain-containing protein</i>	E9AXT 3	4UOS	1,2,3,4	5,6	31
<i>C3H1-type domain-containing protein</i>	E9AZ3 6	1U1J	1,2,3,4	5,6	54
<i>Putative 5-methyltetrahydropteroyltri glutamate--homocyst ei nemethyltransferase</i>	E9B1E 9	3D2F	1,2,3,4	5,6	64
<i>Succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like protein</i>	E9B201	1FUU	1,2,3,4	5,6	54
<i>Superoxide dismutase</i>	E9B2V 9	4ZHJ	1,2,3,4	5,6	65
<i>Uncharacterized protein 1</i>	E9B4N 8	NM	1,2,3,4	5,6	180
<i>Uncharacterized protein</i>	Q4QBL 4	4NOX	1,3,4	5,6	91
<i>Paraflagellar rod protein 4</i>	Q86PL 6	NM	1,2,3,4	5,6	56
Total	70				

*Preditores de epítomos lineares: 1- Bepipred; 2- BC Pred; 3- ABC Pred; 4- Ellipro

**Preditores de epítomos não lineares: 5- Discotope; 6- Ellipro.

PDB = *Protein data bank*

***Proteínas marcadas em rosa: controles; proteínas marcadas em azul: quantificadas apenas em LaAg(s); proteínas marcadas em cinza: quantificadas apenas em LnAg(s); proteínas marcadas em amarelo: quantificadas em comum em LaAg(s) e em LnAg(s).

ANEXO II

Predição de epítomos de proteínas quantificadas nos antígeno LaAg(s) e LnAg(s). Dados dos preditores NetMHCIIpan e IEDB, número de ligações epítomo-HLA II e de diferentes alelos de HLA II reconhecidos por cada proteína.

Net MHCIIpan

IEDB

ID Uniprot	Descrição da proteína	Total de epítops	Alelos de HLA II	Total de epítops	Alelos HLA II
------------	-----------------------	------------------	------------------	------------------	---------------

Q7K7 40	<i>Circumsporozoite protein (P. falciparum)</i>	19	11	33	7
Q811 58	<i>HBsAg (Hepatitis B vírus)</i>	29	9	116	10
P0C2 T1 (A85A_ MYCBO)	<i>Ag85A (M. bovis)</i>	84	23	54	10
E9AP T8	<i>Putative immunodominant antigen (Tc40 antigen-like)</i>	375	23	495	23
E9BB K0	<i>Uncharacterized protein</i>	323	22	122	17
E9A N57	<i>Leishmanolysin</i>	268	21	180	14
E9A N56	<i>Leishmanolysin</i>	236	19	102	14
E9B5 S3	<i>Uncharacterized protein</i>	214	23	72	12

E9A N73	<i>Flagellar glycoprotein-like protein</i>	205	22	256	18
E9B4 89	<i>Uncharacteri zed protein</i>	203	22	79	11
E9AL Y9	<i>Guanine deaminase</i>	191	19	83	13
E9A MV3	<i>Uncharacteri zed protein</i>	188	23	95	16
E9B5 73	<i>Regulatory subunit of protein kinase a- like protein</i>	175	20	66	13
E9AY H6	<i>Uncharacteri zed protein</i>	160	20	46	11
E9A QV6	<i>Paraflagellar rod protein 2C</i>	157	19	82	15
Q253 27	<i>Membrane- bound acid phosphatase</i>	150	22	84	13

E9AMU		100	22	27	4
9	<i>Elongation factor-1 gamma</i>				
A0A088RNC4	Uncharacterized protein	995	22	237	5
A0A088S1Z8	9TRYP Uncharacterized protein	558	22	130	3
A4H6M6	Pyruvate, phosphate dikinase	472	23	144	4
A0A1E1IX30	Putative regulatory subunit of protein kinase a-like protein	325	23	69	1
A0A1E1ITR4	Heat shock protein, putative	292	20	77	2
A0A1E1J342	Uncharacterized protein	287	22	79	1
Q2HZY7	Elongation factor 2	279	22	80	1
A0A1	Uncharacterized protein	269	19	67	1

E1J9A6	zed protein				
A0A1	Eukaryotic	255	22	54	2
E1J905	translation initiation factor 3 subunit L				
A0A1	Putative thiol-	244	22	65	1
E1J4H2	dependent reductase 1				
A0A1	Uncharacteri	242	21	34	1
E1J0C7	zed protein				
A0A1	Arginine N-	210	20	46	1
E1INC0	methyltransferas e, putative				
A4H3	Uncharacteri	203	17	37	1
T7	zed protein (Fragment)				
A4HJ	Putative	203	18	99	2
14	calpain-like cysteine peptidase				
A4H8	Putative	196	22	53	1
W3	peptidase t				
A4H	Agmatinase-	195	21	35	1

CM0	like protein				
A4H7 16	Putative carboxypeptidase	191	22	69	1
A0A1 E1IU52	NLI- interacting factor, putative	190	19	42	2
A4HI G5	Uncharacteri zed protein	185	17	88	1
A4H3 W4	Putative calpain-like cysteine peptidase	179	21	41	2
A4HF W1	Putative trypanothione synthetase	175	20	32	2
E9AT V9	<i>Uncharacteri zed protein</i>	1649	23	348	23
A0A1 E1J931	<i>Uncharacteri zed protein</i>	378	22	101	16
A0A5 04XIF1	<i>Kinesin motor domain family protein</i>	234	22	73	14
A4H7	<i>Putative</i>	504	22	142	15

P6	<i>immunodominant antigen</i>				
A4H8 U7	<i>Uncharacterized protein</i>	328	19	65	11
A4H9 88	<i>Putative translation initiation factor</i>	265	22	74	13
A4HF K9	<i>Uncharacterized protein</i>	317	23	117	18
E8N HG6	<i>Uncharacterized protein</i>	259	19	59	10
E9AJ R2	<i>FYVE-type domain-containing protein</i>	276	19	80	13
E9A NN3	<i>Uncharacterized protein</i>	675	22	140	16
E9A Q01	<i>Uncharacterized protein</i>	121	15	64	11
E9A QY8	<i>Uncharacterized protein</i>	552	23	105	17
E9A RS1	<i>Putative heat shock protein</i>	253	20	73	14

E9A	<i>Putative</i>	329	22	71	13
UD5	<i>eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8</i>				
Total	49				

**Total: Considerando-se apenas as proteínas dos antígeno LaAg(s) e LnAg(s), não considerando as proteínas usadas como controles.

*** Proteínas marcadas em rosa: controles

****Proteínas marcadas em azul: Proteínas quantificadas apenas em LaAg(s); Proteínas marcadas em cinza: quantificadas apenas em LnAg(s). Proteínas marcadas em amarelo: comuns aos dois antígenos.

ANEXO III

Predição de epítomos de proteínas quantificadas nos antígeno LaAg(s) e LnAg(s). Dados dos preditores NetMHCIIpan e IEDB, número de ligações epítomo-HLA I e de diferentes alelos de HLA I reconhecidos por cada proteína.

Acesso Uniprot	Descrição da proteína	Número de epítomos	Alelos de HLA I	Número de epítomos IEDB	Alelos de HLA I IEDB
Q5R2 L8	<i>Circumsporo zoite (P. falciparum)</i>	43	22	64	19
Q811 58	<i>HBsAg (HBV)</i>	87	25	83	25

P0C2 T1 (A85A_M YCBO)	<i>Acyltransferase/mycolyltransferase Ag85A (M. bovis)</i>	62	27	51	21
Q253 27	<i>Membrane-bound acid phosphatase</i>	225	27	138	26
E9B5 S3	<i>Uncharacterized protein</i>	189	27	139	27
E9AM U9	<i>Elongation factor-1 gamma</i>	182	27	120	26
E9BB K0	<i>Uncharacterized protein</i>	180	27	126	26
E9AN 56	<i>Leishmanolysin</i>	173	27	133	27
E9AY H6	<i>Uncharacterized protein</i>	143	27	108	25
E9AN 73	<i>Flagellar glycoprotein-like protein</i>	142	27	107	26
E9AP T8	<i>Putative immunodominant antigen</i>	142	27	146	27
E9AM V3	<i>Uncharacterized protein</i>	140	27	105	27
E9AN 57	<i>Leishmanolysin</i>	134	27	114	25
A0A088 RNC4_ A	<i>9TRYP Uncharacterized protein</i>	443	27	198	23

A0A088 S1Z8_A	<i>9TRYP</i> Uncharacterize d protein	276	27	225	27
A0A1E1 J905_A	<i>Eukaryotic</i> translation initiation factor 3 subunit L	188	27	129	26
Q2HZY 7	<i>Elongation</i> factor 2	175	27	157	27
A0A1E1 IX30_A	<i>Putative</i> regulatory subunit of protein kinase a-like protein	166	27	118	27
A0A1E1 J342_A	Uncharacterize d protein	162	27	163	27
A0A1E1 ITR4_A	<i>Heat shock</i> protein, putative	159	27	136	25
A0A1E1 J9A6_A	Uncharacterize d protein	148	27	91	25

tA4HAD 8	<i>LEIBR Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34</i>	131	26	92	25
A0A1E1 J0C7_A	<i>Uncharacterize d protein</i>	127	26	106	24
E9AT V9	<i>Uncharacteri zed protein</i>	661	27	900	27
Q4QB L4	<i>Uncharacteri zed protein</i>	327	27	278	27
E9B4 N8	<i>Uncharacteri zed protein</i>	217	27	350	27
E9AQ Y8	<i>Uncharacteri zed protein</i>	216	27	312	27
E9AN N3	<i>Uncharacteri zed protein</i>	217	27	310	27
E9AR S1	<i>Uncharacteri zed protein</i>	179	27	280	25
E9B1 E9	<i>Putative 5- methyltetrahydro pteroyltriglutama te--homocyst ei nemethyltransfer ase</i>	186	27	277	27
A4HF K9	<i>Uncharacteri zed protein</i>	191	27	159	27

A4H8	<i>Uncharacteri</i>				
U7	<i>zed protein</i>	194	27	143	26
	<i>Putative 5-</i>				
	<i>methyltetrahydro</i>				
A4H9	<i>pteroyltriglutama</i>				
88	<i>te--homocyst ei</i>	199	27	142	27
	<i>nemethyltransfer</i>				
	<i>ase</i>				
	<i>Total</i>	30			

*Total: Considerando-se apenas as proteínas do antígeno LaAg(s), não considerando as proteínas usadas como controles.

** Proteínas marcadas em rosa: Controles

***Proteínas marcadas em rosa: proteínas controle. Marcadas em azul: proteínas quantificadas apenas em LaAg(s): Proteínas marcadas em cinza: quantificadas apenas em LnAg(s) e marcadas em amarelo: quantificadas em comum em LaAg(s) e em LnAg(s).