

Leopoldo Fabrício Marçal do Nascimento¹,
Luana Dias de Moura²,
Rebecca Tavares Lima³,
Maria do Socorro Pires e Cruz^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal/CCA/UFPI

²Programa de Pós-graduação em
Tecnologias Aplicadas a Animais de
Interesse Regional/CCA/UFPI

³Médica Veterinária Autônoma

✉ **Maria Cruz**
Rua Santa Catarina, 886, Piçarra,
Teresina-PI
CEP: 64015-090
✉ mspcruz@gmail.com

Submetido: 26/01/2019
Aceito: 10/05/2019

RESUMO

Atualmente, muitas das vacinas em desenvolvimento são aquelas compostas de proteínas antigênicas individuais de parasitas ou uma combinação de vários antígenos individuais que são produzidos como produtos recombinantes obtidos por técnicas de biologia molecular. Dentre elas a Leish-111f e sua variação Leish-110f tem ganhado destaque na proteção contra a LV e LC e alcançaram estudos de fase II em seres humanos. A eficácia de uma vacina é otimizada pela adição de adjuvantes imunológicos. No entanto, embora os adjuvantes tenham sido usados por mais de um século, até o momento, apenas alguns adjuvantes são aprovados para o uso em humanos, a maioria destinada a melhorar a eficácia da vacina e a produção de anticorpos protetores específicos do antígeno. Os mecanismos de ação dos adjuvantes imunológicos são diversos, dependendo da sua natureza química e molecular sendo capazes de ativar células imunes específicas que conduzem a respostas imunes inatas e adaptativas melhoradas. Embora o mecanismo de ação molecular detalhado de muitos adjuvantes ainda seja desconhecido, a descoberta de receptores Toll-like (TLRs) forneceu informações críticas sobre o efeito imunostimulador de numerosos componentes bacterianos que envolvem interação com receptores TLRs, mostrando que estes ligantes melhoram tanto a qualidade como a quantidade de respostas imunes adaptativas do hospedeiro quando utilizadas em formulações de vacinais direcionadas para doenças. O potencial desses adjuvantes de TLR em melhorar o design e os resultados de várias vacinas está em constante evolução, à medida que novos agonistas são descobertos e testados em modelos experimentais e estudos clínicos de vacinação. Nesta revisão, é apresentado um resumo do progresso recente no desenvolvimento de proteínas recombinantes de segunda geração e adjuvantes de TLR, sendo o foco principal nos TLR4 e suas melhorias.

Palavras-chave: proteínas recombinantes, adjuvantes, vacina, leishmaniose

ABSTRACT

Many of the vaccines in development are currently composed of individual antigenic proteins from parasites or a combination of several individual antigens that are produced as recombinant products obtained by molecular biology techniques. Among them, Leish-111f and its Leish-110f variation have gained prominence in protection against LV and LC and already have Phase II clinical trials in humans. The efficacy of a vaccine is optimized by the addition of immunological adjuvants. However, although adjuvants have been used for more than a century, until present date, only a few adjuvants are approved for use in humans, most intended to improve vaccine efficacy, the production of antigen-specific protective antibodies and an appropriate cell-immune response. The mechanisms of action of immunological adjuvants are diverse depending on their chemical and molecular nature being able to activate specific immune cells leading to improved innate and adaptive immune responses. Although the molecular mechanism of action of many adjuvants is still unknown, the discovery of Toll-like receptors (TLRs) has provided critical information on the immunostimulatory effect of numerous bacterial components involving interaction with TLR showing that these ligands improve both the quality as the amount of host adaptive immune responses when used in vaccine formulations. The potential of these TLR adjuvants in improving the design and results of many vaccines is in constantly evolution as new molecules agonists are discovered and tested in experimental models and clinical trials as well. In this review, a summary of recent progress in the development of second generation recombinant proteins and adjuvants of TLR is presented, being the main focus in TLR4 and its improvements.

Keywords: recombinant proteins, adjuvants, vaccine, leishmaniasis

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença de curso crônico, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma das sete doenças tropicais mais importantes e representa um grave problema de saúde mundial possuindo amplo espectro de manifestações clínicas com resultado potencialmente fatal (ALVAR et al., 2012; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Estima-se que mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) está concentrada em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2019). No Brasil, a LV é uma doença emergente, obtendo-se registro de casos em 21 estados da federação, sendo as principais áreas endêmicas localizadas nas regiões norte e nordeste devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações, predominando principalmente nos estados do Tocantins, Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (RATH et al., 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Em 2017 a média anual de casos no país foi de 4.103 casos humanos, com incidência de dois casos/100.000 habitantes, com maior ocorrência na Região Nordeste, e no mesmo ano o Brasil notificou 327 óbitos humanos de LV, com maior registro na Região Norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Atualmente poucos medicamentos estão disponíveis para o tratamento da leishmaniose e a maioria deles está em uso há bastante tempo, dentre eles estão o antimonial pentavalente que foi a primeira classe de drogas aplicadas ao tratamento da leishmaniose e que juntamente com a miltefosine e paromomicina, constituem os principais recursos disponíveis para a quimioterapia das leishmanioses (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017; RIBEIRO et al., 2018).

A OMS preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia e devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e conseqüente aumento das formas resistentes de parasitas, e o aumento da dosagem induz alta toxicidade. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são efeitos colaterais frequentemente associados ao uso destas drogas (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

Devido à falta de tratamentos eficazes e a resistência do parasita aos fármacos disponíveis, esforços consideráveis foram dedicados ao desenvolvimento de vacinas e, embora estudos iniciais tenham sofrido com efeitos colaterais desagradáveis, resultando em complicações clínicas, vários antígenos de *Leishmania* foram explorados como candidatos promissores para uma vacina. Esses antígenos incluíam parasitas de *Leishmania* mortos ou vivos atenuados (primeira geração), proteínas recombinantes de *Leishmania* (segunda geração), DNA codificador de proteínas *Leishmania* (terceira geração) e imunomoduladores (ABDIAN et al., 2011; ARAÚJO et al., 2011; NAGILL; KAUR, 2011; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; ALVAR et al., 2013; KUMAR; ENGWERDA, 2014; GRADONI,

2015).

Dessa forma, o objetivo desta revisão foi trazer informações atualizadas sobre a o desenvolvimento de antígenos de *Leishmania* capazes de conferir proteção contra a leishmaniose, bem como a utilização de adjuvantes capazes de modular e potencializar a resposta imune.

REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose é um espectro de manifestações clínicas causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, que são parasitas intracelulares com ciclo de vida complexo que requerem um hospedeiro susceptível e um vetor permissivo (AKHOUNDI et al., 2016; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Assim, as leishmanioses podem assumir diferentes formas clínicas que são englobadas em dois principais grupos: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT), onde a LV geralmente afeta o baço, fígado ou outros tecidos linfoides e, se não for tratada, é fatal (MURRAY et al., 2005; ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012).

Já a LT pode ser classificada com base em seus aspectos clínicos, patológicos e imunológicos em leishmaniose cutânea localizada, quando o paciente apresenta lesões ulcerosas indolores únicas ou múltiplas; a cutaneomucosa, caracterizada por lesões mucosas agressivas nas regiões nasofaríngeas ou ainda como cutânea difusa, que se apresenta em lesões nodulares não ulceradas espalhadas pelo corpo (GHARBI et al., 2015).

Os parasitas do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) são flagelados da Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida, Filo Protozoa e incluem vários protozoários obrigatórios de seres humanos e mamíferos domésticos e selvagens. Com base na localização no intestino do vetor, (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987) distinguiram em dois subgêneros: *Leishmania* (que inclui o complexo donovani, tropica, major, aethiopica, mexicana), que se replica no intestino médio e o *Viannia* (que inclui o complexo *braziliensis*, *guyanensis*, *lainsoni*, *naifi*), que se replica no intestino posterior (READY, 2013; GHARBI et al., 2015).

A transmissão dos protozoários desse gênero se dá entre hospedeiros humanos e animais pela picada de fêmeas de flebotomíneo infectadas no ato do repasto sanguíneo, sendo estas pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, encontrado no "Velho Mundo", que inclui Europa, Ásia e África e *Lutzomyia*, nas Américas (MAROLI et al., 2013; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014), onde de aproximadamente 900 espécies de flebotomíneos, em torno de 70 tem sido implicada na transmissão da leishmaniose (READY, 2013). No Brasil, o principal vetor envolvido na transmissão do parasita são flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, mas no Estado do Mato Grosso do Sul (MS) já se tem registrado transmissão através da espécie *Lutzomyia cruzi* (BRITO et al., 2014; FERNANDES et al., 2017).

Em humanos (KAYE; AEBISCHER, 2011), camundongos (LIEW; O'DONNELL, 1993) e cães (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017;

PEREIRA-FONSECA et al., 2017), a imunidade protetora contra a leishmaniose depende do desenvolvimento de respostas imunes mediadas por linfócitos T CD4+, tipo T Helper 1 (Th1), caracterizadas pela produção inicial de Interleucina-12 (IL-12) pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), que induzem a secreção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (RODRIGUES et al., 2016; HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017; PEREIRA-FONSECA et al., 2017), estas por sua vez, induzirão a ativação dos mecanismos microbicida dos macrófagos.

Com a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que são altamente eficazes na morte de formas amastigotas intracelulares (KAYE; SCOTT, 2011; PEREIRA-FONSECA et al., 2017), enquanto a resposta imune mediada por células de perfil Th2 e predomínio de linfócitos T CD8+ (KAYE; SCOTT, 2011; RODRIGUES et al., 2016), com produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento (TGF)- β , com resposta humoral exuberante, está relacionada à doença progressiva (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; RODRIGUES et al., 2016; HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

O sistema imune inato tem mecanismos específicos para reconhecer rapidamente o parasita. Um componente importante do reconhecimento de patógenos compreende a família de receptores Toll-like (TLRs), que são receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e são responsáveis por detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de vários grupos de microrganismos (OSPELT; GAY, 2010), incluindo *Leishmania* spp. (TUON et al., 2008; CHAUHAN et al., 2017) e que reconhecem Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs), que são proteínas derivadas do hospedeiro (MIYAKE, 2007; PICCININI; MIDWOOD, 2010) na inflamação crônica, desencadeando uma cascata de reações imunes (FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009). Até o momento, 13 TLRs foram descritos em mamíferos. Dez TLRs são expressos em humanos, 12 em camundongos (CHAUHAN et al., 2017) e 10 em cães (CUSCÓ et al., 2014).

Antígenos contra leishmania

A quimioterapia é a principal forma de controle das Leishmanioses. Atualmente não existe nenhuma vacina disponível para seres humanos e em cães as vacinas existentes não possuem boa eficácia. No Brasil o Ministério recomenda apenas como medida de proteção individual para cães a vacinação contra *L. infantum*. Nesse respeito, a vacina Leish-Tec®, do laboratório Hertape Calier Saúde Animal é a utilizada no país, registrada e aprovada a sua utilização pelo MAPA e MS, em que apenas animais soronegativos podem ser vacinados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), entretanto a vacina não protege cem por cento dos cães, portanto animais vacinados podem adquirir a infecção e tornarem-se portadores infectantes para o

vetor.

Vários antígenos candidatos foram propostos nas últimas décadas (KUMAR; ENGWERDA, 2014), alguns mostraram ser imunogênicos e conferiram proteção contra *Leishmania* em modelos de roedores. No entanto, a maioria deles foi descartada depois de provar ser ineficaz em grandes animais (GRADONI et al., 2005; KUMAR; ENGWERDA, 2014).

Como resultado da pesquisa sobre o desenvolvimento de vacinas contra a LVC, o Brasil tornou-se o primeiro país do mundo a oferecer vacinas disponíveis comercialmente para imunizar cães (FERNANDES et al., 2014). Em 2014, duas vacinas disponíveis comercialmente foram licenciadas pelo Ministério da Agricultura para uso em cães: Leish-Tec® (Hertape SA, Juatuba, Brasil), que contém uma proteína amastigota recombinante específica para o estágio de diferentes espécies de *Leishmania* (rA2) mais saponina como adjuvante (COELHO et al., 2003; ZANIN et al., 2007; FERNANDES et al., 2008; CARVALHO et al., 2018) e a Leishmune® (Zoetis, Campinas, Brasil), composto de glicoproteínas semi-purificadas do ligante fucose manose (FML) de *Leishmania donovani* e saponina (SILVA et al., 2000; BORJA-CABRERA et al., 2002; PARRA et al., 2007).

No entanto, em novembro de 2014, o Ministério da Agricultura do Brasil suspendeu a licença provisória concedida à vacina Leishmune® por não atender totalmente aos requisitos de um ensaio clínico de vacina de fase III (DE MENDONÇA et al., 2016). Em um estudo prospectivo (FERNANDES et al., 2014), 92,9% dos cães imunizados com Leish-tec® permaneceram saudáveis durante o período de 11 meses de acompanhamento. Já no estudo de fase III randomizado, realizado em cães de uma área endêmica no estado de Minas Gerais, foi observado que a vacina possui uma eficácia de 80,8% e uma redução de 46,6% na transmissão para flebotomíneos alimentados de cães vacinados durante o xenodiagnóstico (REGINA-SILVA et al., 2016). Já estudos avaliando a Leishmune® como uma vacina profilática em cães expostos à infecção natural mostraram taxas similares de resultados clínicos, variando de 83,3% (DE AMORIM et al., 2010) a 95% (BORJA-CABRERA et al., 2002). Dessa forma, o sucesso das vacinas contra a LVC encoraja os cientistas para o desenvolvimento da vacina contra a leishmaniose humana.

Nas últimas décadas, as vacinas de segunda geração passaram a ser amplamente utilizadas e são baseadas na definição de subunidades sintéticas ou recombinantes geneticamente modificada de *Leishmania* sp., através de bactérias recombinantes ou de vírus que carregam genes do antígeno de *Leishmania* (CONNELL et al., 1993; MCMAHON-PRATT et al., 1993) e nas frações nativas purificadas dos parasitas (PALATNIK et al., 1989; JARDIM et al., 1991; RACHAMIM; JAFFE, 1993).

Várias proteínas de *Leishmania* foram identificadas, com base na abundância e localização de superfície (HANDMAN et al., 1986), clones de células T, triagem de pools de antígenos (MELBY et al., 2000) e seleção de

são com soros de animais e humanos infectados (REED; BADARO; LLOYD, 1987; SKEIKY et al., 1995a, 1998; WEBB et al., 1996, 1998; RAFATI et al., 2001). Estes incluem a glicoproteína 63 (gp63), glicoproteína 46 da membrana (gp46, também conhecida como M-2), ligante fucose manose (FML), homólogo de receptores *Leishmania* para C quinase ativada (p36/LACK), NH36, quimera Proteína Q, proteinase cisteína B (CP), antígenos CPA, GRP78, LD1, proteína de superfície acilada hidrofílica B1 (HASP B1), LCR1, proteína salivar 15 (SP15), antígeno de superfície promastigota 2 (PSA-2), A-2, histona H1, fator de alongamento e iniciação de *L. brasiliensis* (LeIF), homólogo de *L. major* da proteína indutível por estresse eucariota-1 (LmSTI1), homólogo de *L. major* do antioxidante específico de tiol eucariótico (TSA) e Leish-111f (NAGILL; KAUR, 2011; JAIN; JAIN, 2015).

Com uma ampla coleção de antígenos de *Leishmania*, é improvável que uma vacina ideal contra a leishmaniose consista em um único antígeno. Então, vários autores tem buscado selecionar antígenos com capacidade para proteger camundongos e primatas, e testar combinações de antígenos em modelos profiláticos e terapêuticos (COLER; REED, 2005). Das muitas proteínas testadas, três das que apresentaram melhor resposta (TSA, LmSTI1 e LeIF) para a leishmaniose, foram selecionados para inclusão em uma vacina baseada em subunidades (SKEIKY et al., 2002).

Estudos anteriores utilizando essas proteínas em combinação ou isoladas, demonstraram que uma mistura de TSA e LmSTI1 foi responsável por induzir uma boa proteção em modelos primatas e murinos, na forma de vacina profilática para a leishmaniose cutânea (CAMPOS-NETO et al., 2001). O terceiro componente, LeIF, mostrou conferir proteção parcial no modelo BALB/c como vacina terapêutica, uma propriedade atribuída à sua atividade adjuvante promotora de resposta do tipo Th1 (PROBST et al., 1997; SKEIKY et al., 1995a, 1998; BORGES et al., 2001).

No entanto, do ponto de vista prático, uma vacina que consiste em múltiplas proteínas recombinantes seria difícil e cara de fabricar, sendo então construída uma proteína de fusão recombinante de 111kDa, denominada Leish-111f (conhecida também como Leish-F1 ou MML), composta de uma única poli proteína recombinante que compreende as sequências de três proteínas geneticamente ligados em série (na ordem TSA – LmSTI1 – LeIF) que estão presentes nas formas amastigota e promastigotas do parasita e são altamente conservadas entre espécies do gênero *Leishmania*, que é um requisito para assegurar a proteção entre espécies (SKEIKY et al., 1995b, 1998; WEBB et al., 1996, 1998) surgindo como candidato promissor a uma vacina de segunda geração.

A formulação da poli proteína recombinante Leish-111f em formulação com Monofosforil lipídio A mais emulsão de esqualeno (MPL-SE) demonstrou proteger ratos, hamsters e macacos rhesus contra LV e LC (SKEIKY et al., 2002; COLER et al., 2007), embora não protegesse consistentemente os cães contra a LV (GRADONI et al., 2005; MORENO et al., 2007; MIRET et al., 2008). Dessa forma, a Leish-111f foi a primeira vacina de subunidade para leishmaniose que

alcançou estudos clínicos de fase I e II em seres humanos (VÉLEZ et al., 2009; LLANOS-CUENTAS et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2010; CHAKRAVARTY et al., 2011).

Posteriormente, outras modificações à proteína de fusão Leish-111f foram feitas para simplificar a fabricação; as melhorias do processo incluíram a remoção do marcador seis-His N-terminal e a mutação de um ponto quente proteolítico para reduzir a degradação proteica. A nova construção de 110kDa foi nomeado Leish-110f (conhecida também com F2) (VEDVICK et al., 2008).

Outro grande avanço no desenvolvimento de vacinas candidatas contra a leishmaniose, assim como outras doenças que requerem respostas de células T potentes e dirigidas, ocorreu com a identificação de adjuvantes capazes de induzir respostas Th1. A descoberta de que agonistas apropriadamente formulados do receptor do tipo Toll-like (TLR) podem estimular respostas imunes Th1 tem impactado profundamente o desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares como *Leishmania* (BETHONY et al., 2011).

Adjuvantes imunológicos

O termo adjuvante originou-se da palavra latina *adjuvare* que significa ajudar (SCHIJNS, 2000). Qualquer material que aumente ou ocasione resposta imune a um antígeno é considerado um adjuvante. Adjuvantes são substâncias imunopotencializadoras, podendo ser compostos naturais ou sintéticos. O uso de adjuvantes em vacinas é particularmente importante quando o antígeno possui baixa imunogenicidade. Isto se aplica para antígenos constituídos por subunidades de peptídeos e peptídeos recombinantes, cuja estrutura e conformação são menos complexas que vírus e bactérias intactos inativados. A utilidade de um adjuvante é dependente de sua segurança e capacidade em estimular a imunidade por longos períodos (CHIN; GIL, 1998).

Os adjuvantes são usados para ajudar o antígeno a desencadear uma resposta imune rápida, intensa e duradoura utilizando a menor quantidade de antígeno possível (GUPTA; SIBER, 1995; HE et al., 2000), podendo assim diminuir custos na produção de vacinas.

Os adjuvantes de vacina são críticos para o desenvolvimento efetivo de respostas protetoras com muitos antígenos. Os adjuvantes do agonista do receptor do tipo Toll-like (TLR) são particularmente promissores, pois envolvem o sistema imune inato para estimular uma resposta imune adaptativa mais forte e durável (REED; ORR; FOX, 2013).

Os TLRs participam do controle de infecções pela regulação da resposta imune inata mediada por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), como glicolipídios, peptidoglicanos e lipopeptídeos, comuns em um grande grupo de microrganismos e são responsáveis por mediar as respostas imunes pela produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-12 e óxido nítrico (NETEA et al., 2004; JAIN; JAIN, 2015).

Os TLRs são divididos em dois subgrupos, dependendo da sua localização celular e dos respectivos ligantes de PAMPs. Um grupo é composto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11, que são expressos na superfície celular e reconhecem principalmente componentes da membrana microbiana, como lipídios, lipoproteínas e proteínas; o outro grupo é composto de TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, que são expressos exclusivamente em vesículas intracelulares, como o retículo endoplasmático (RE), endossomos, lisossomos e endolisossomos, onde reconhecem os ácidos nucleicos microbianos (MOGENSEN, 2009; KAWAI; AKIRA, 2010). O ligante para o TLR10 é desconhecido (KAWAI; AKIRA, 2010).

Desde então, ligantes para TLR7/8 (Imiquimod, Resiquimod) (VASILAKOS; TOMAI, 2013), TLR9 (CpG) (SCHEIERMANN; KLINMAN, 2014; SHIROTA; KLINMAN, 2014), TLR5 (Flagellin) (MIZEL; BATES, 2010) e TLR 4 (ALVING et al., 2012; IRETON; REED, 2013; REED; ORR; FOX, 2013) foram avaliados pré-clinicamente como componentes de adjuvantes de vacinas.

Dos 11 membros da família TLR, o TLR4 e o TLR9 contribuem principalmente na resposta imune contra a infecção por *Leishmania*. Também foi sugerido que esses dois TLRs desempenham um papel possível no mecanismo antileishmanial da miltefosina. Assim, esses receptores também poderiam ser fatores importantes na concepção da vacina candidata adequada contra a infecção por *Leishmania*, bem como no sistema de liberação direcionada de drogas para o tratamento da leishmaniose (SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011; MUKHERJEE et al., 2012).

O agonista de TLR4 mais conhecido é o lipopolissacarídeo (LPS) que se apresenta na membrana externa das bactérias Gram-negativas, apresentando muitos efeitos adversos e para superar esses efeitos adversos, foram introduzidas variações modificadas do LPS, cada uma com características únicas e potencial de ativação de TLR4, incluindo derivados biológicos da molécula LPS original, como o monofosforil lipídeo A (MPL) (COLER et al., 2011), bem como substitutos totalmente sintéticos. O MPL é um derivado do LPS obtido a partir da *Salmonella minnesota R595* (BALDRIDGE; CRANE, 1999) e exibe apenas ~ 0,1% da toxicidade inflamatória do LPS (QURESHI et al., 1997; EVANS et al., 2003). Quando usado como adjuvante, o MPL aumenta as respostas imunológicas específicas do imunógeno, promovendo o desenvolvimento de células T CD4+ Th1 (REED et al., 2009).

Moléculas de segunda geração que são sintéticas e alvo para TLR4 também estão sendo desenvolvidas. Algumas delas, como os agonistas sintéticos glicopiranosil lipídico (GLA, também chamado de PHAD ou MPLA sintético) (FOX et al., 2017) e o adjuvante lipídico de segunda geração (SLA) estão sendo desenvolvidas pelo Infectious Disease Research Institute (IDRI) e se mostraram promissores em estudos pré-clínicos e clínicos em seres humanos (ANDERSON et al., 2010; COLER et al., 2011; LOUSADA-DIETRICH et al., 2011).

O GLA é um análogo sintético do Lipídeo A e é baseado

simplesmente na estrutura da molécula natural (COLER et al., 2011; LOUSADA-DIETRICH et al., 2011). Depois que a estrutura do complexo humano MD2/TLR4 foi publicada (PARK et al., 2009), o uso dessa estrutura foi utilizado para projetar um novo agonista. O SLA foi desenvolvido in silico (CARTER et al., 2016) através de modificação racional das cadeias acilares terminais do GLA (COLER et al., 2011), uma molécula precursora agonística de TLR4 atualmente em desenvolvimento clínico de fase II (PAES et al., 2016). O SLA foi desenvolvido para se encaixar melhor no receptor MD2/TLR4 humano e parece ter algumas propriedades benéficas em termos de induzir citocinas de perfil Th1, enquanto mantém baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias (FOX et al., 2017).

A molécula resultante, SLA, tem várias propriedades desejáveis e foi desenvolvida através de ensaios clínicos em humanos (BALDWIN et al., 2016; PAES et al., 2016). Nesses estudos, a molécula de SLA foi capaz de induzir respostas adaptativas mais robustas em humanos do que agonistas de TLR4 similares, e tornou-se um dos principais candidatos para algumas indicações de vacinas em humanos (CARTER et al., 2016; FOX et al., 2017).

Como os TLRs são os primeiros receptores inatos que reconhecem a *Leishmania*, uma terapia direcionada por TLR possui um forte potencial. Da mesma forma, como os ligantes TLR aumentam a resposta imune, eles podem ser usados como adjuvantes nas estratégias profiláticas, sendo essa interação entre *Leishmania* e TLR de grande interesse e foco de pesquisa (CHAUHAN et al., 2017).

DISCUSSÃO

O objetivo final da vacinação é gerar proteção contra doenças. Tal imunidade protetora requer a indução de diferentes respostas do hospedeiro que são induzidas usando formulações de vacina contendo antígenos e adjuvantes apropriados.

Com o avanço do desenvolvimento e identificação de antígenos de superfície de *Leishmania* e a capacidade de criação de proteínas recombinantes por métodos moleculares combinando dois ou mais antígenos, ocorreu uma expansão da produção de vacinas de segunda geração que passaram a impactar profundamente na estratégia vacinal para a leishmaniose visceral, gerando o desenvolvimento e melhoria desses antígenos (COLER; REED, 2005; REZVAN; MOAFI, 2015).

Os adjuvantes por sua vez são componentes importantes das vacinas e podem influenciar os resultados da vacinação, particularmente direcionando as respostas imunes do hospedeiro para a imunidade de células T auxiliares diferentes e aumentando tanto a qualidade como a quantidade de resposta imune contra os antígenos (STEINHAGEN et al., 2011; RAMAN et al., 2012). No entanto, as principais preocupações no desenvolvimento de adjuvantes de vacinas incluem sua segurança e eficiência. Embora o desenho da vacina ainda seja bastante empírico, os avanços recentes na pesquisa imunológica

expandiram nossa compreensão dos mecanismos de ação de vários adjuvantes e melhoraram muito as chances de desenvolvimento bem-sucedido de intervenções seguras e eficazes para prevenir e tratar uma série de doenças humanas por meio da modulação de respostas imunes do hospedeiro (RAMAN et al., 2012; TOUSSI; MASSARI, 2014).

A descoberta de TLRs e seu papel na modulação da imunidade inata e adaptativa levou à exploração de seus ligantes como moduladores imunológicos, devido à sua capacidade de induzir ativação específica de células imunes e influenciar a imunidade adaptativa do hospedeiro. A vantagem dos adjuvantes TLR não é apenas na sua capacidade de induzir preferencialmente respostas Th1 ou Th2 e desenvolvimento de células T CD4 + ou CD8 +, mas também para modular a ativação de células B e aumentar a secreção de anticorpos para antígenos imunogênicos, melhorando a qualidade e quantidade de produção de anticorpos específicos (RAMAN et al., 2012; TOUSSI; MASSARI, 2014).

CONCLUSÃO

O aumento do uso de proteínas recombinantes levará inevitavelmente a um maior uso de adjuvantes. A partir do exame crítico de um grande número de vacinas candidatas exploradas para leishmaniose visceral, pode-se concluir que as vacinas de segunda geração, baseadas em proteínas recombinantes, podem ser capazes de conferir proteção de longo prazo contra a leishmaniose visceral. Da mesma forma, os resultados nas respostas imunes humorais e celulares de várias pesquisas apoiam fortemente a possibilidade da vacina antileishmanial. O uso de novos sistemas de administração de fármacos, adjuvante adequado ou combinação de dois ou mais antígenos de *Leishmania* pode facilitar o desenvolvimento de uma vacina promissora. Além disso, pesquisas mais sistemáticas e bem planejadas são necessárias para investigar possíveis candidatos a antígenos para o desenvolvimento de uma vacina cada vez mais segura e eficaz contra a leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS

ABDIAN, N. et al. Evaluation of DNA/DNA and prime-boost vaccination using LPG3 against *Leishmania* major infection in susceptible BALB/c mice and its antigenic properties in human leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 627–636, 1 mar. 2011.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 3 mar. 2016.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.

ALVAR, J. et al. Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 31, n. SUPPL2, p. B244–B249, 2013.

ALVING, C. R. et al. Adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 3, p. 310–315, 1 jun. 2012.

ANDERSON, R. C. et al. Physicochemical characterization and biological activity of synthetic TLR4 agonist formulations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 123–132, 2010.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: New insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 109–118, 1 fev. 2012.

ARAÚJO, M. S. S. et al. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 141, n. 1–2, p. 64–75, 15 maio 2011.

BALANÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435–443, 1998.

BALDRIDGE, J. R.; CRANE, R. T. Monophosphoryl lipid A (MPL) formulations for the next generation of vaccines. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 19, n. 1, p. 103–7, set. 1999.

BALDWIN, S. L. et al. Synthetic TLR4 agonists enhance functional antibodies and CD4+ T-cell responses against the *Plasmodium falciparum* GM22.6C multi-stage vaccine antigen. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2207–2215, 2016.

BETHONY, J. M. et al. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Immunological Reviews**, v. 239, n. 1, p. 237–270, 2011.

BORGES, M. M. et al. Potent Stimulation of the Innate Immune System by a *Leishmania brasiliensis* Recombinant Protein. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5270–5277, 1 set. 2001.

BORJA-CABRERA, G. P. et al. 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**, v. 20, n. 27–28, p. 3277–84, 10 set. 2002.

BRITO, V. N. DE et al. Phlebotomine fauna, natural infection rate and feeding habits of *Lutzomyia cruzi* in Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 899–904, nov. 2014.

CAMPOS-NETO, A. et al. Protection against Cutaneous Leishmaniasis Induced by Recombinant Antigens in Murine and Nonhuman Primate Models of the Human Disease. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 6, p. 4103–4108, 1 jun. 2001.

CARTER, D. et al. A structure-function approach to optimizing TLR4 ligands for human vaccines. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 11, p. e108, 2 nov. 2016.

- CARVALHO, A. G. DE et al. High seroprevalence and peripheral spatial distribution of visceral leishmaniasis among domestic dogs in an emerging urban focus in Central Brazil: a cross-sectional study. **Pathogens and Global Health**, p. 1–8, 20 fev. 2018.
- CHAKRAVARTY, J. et al. 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**, v. 29, n. 19, p. 3531–3537, 2011.
- CHAUHAN, P. et al. Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in Leishmania infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 190, n. 2, p. 167–186, nov. 2017.
- CHIN, J.; GIL, F. S. Skin delivery of a hybrid liposome/ISCOM vaccine implicates a role for adjuvants in rapid modulation of inflammatory cells involved in innate immunity before the enhancement of adaptive immune responses. **Immunology and Cell Biology**, v. 76, n. 3, p. 245–255, maio 1998.
- COELHO, E. A. F. et al. Immune Responses Induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, 1 jul. 2003.
- COLER, R. N. et al. Leish-111f, a Recombinant Polyprotein Vaccine That Protects against Visceral Leishmaniasis by Elicitation of CD4+ T Cells. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4648–4654, 1 set. 2007.
- COLER, R. N. et al. Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16333, 26 jan. 2011.
- COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 5, p. 244–9, maio 2005.
- CONNELL, N. D. et al. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 24, p. 11473–7, 15 dez. 1993.
- CUSCÓ, A. et al. Non-synonymous genetic variation in exonic regions of canine Toll-like receptors. **Canine Genetics and Epidemiology**, v. 1, n. 1, p. 11, 2014.
- DE AMORIM, I. F. G. et al. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune® vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1–2, p. 55–63, 11 out. 2010.
- DE MENDONÇA, L. Z. et al. Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.
- EVANS, J. T. et al. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. **Expert review of vaccines**, v. 2, n. 2, p. 219–29, abr. 2003.
- FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 29 out. 2008.
- FERNANDES, C. B. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1287–1295, 2014.
- FERNANDES, W. DE S. et al. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban area, Central-West of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, n. December 2016, p. 1–8, 2017.
- FOX, C. B. et al. Current Status of Toll-Like Receptor 4 Ligand Vaccine Adjuvants. In: **Immunopotentiators in Modern Vaccines**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 105–127.
- FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in Immunology**, v. 21, n. 4, p. 242–253, ago. 2009.
- GHARBI, M. et al. Leishmaniosis (Leishmania infantum infection) in dogs. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 34, n. 2, p. 613–626, 2015.
- GRADONI, L. et al. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from Leishmania infantum infection and to prevent disease progression in infected animals. **Vaccine**, v. 23, n. 45, p. 5245–5251, 1 nov. 2005.
- GRADONI, L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 94–100, 28 fev. 2015.
- GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, n. 14, p. 1263–1276, 1 jan. 1995.
- HANDMAN, E. et al. Passive transfer of Leishmania lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 137, n. 11, p. 3608–13, 1 dez. 1986.
- HE, Q. et al. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 7, n. 6, p. 899–903, nov. 2000.
- HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 01, p. 95–115, 20 jan. 2017.

- IRETON, G. C.; REED, S. G. Adjuvants containing natural and synthetic Toll-like receptor 4 ligands. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 7, p. 793–807, 9 jul. 2013.
- JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1–12, jul. 2015.
- JARDIM, A. et al. The Leishmania donovani lipophosphoglycan T lymphocyte-reactive component is a tightly associated protein complex. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 147, n. 10, p. 3538–44, 15 nov. 1991.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 20 maio 2010.
- KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1462–1470, 1 out. 2011.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 jul. 2011.
- KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniasis due to Leishmania infantum/chagasi. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527–538, 7 mar. 2014.
- KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 3, p. e13, mar. 2014.
- LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421–424, set. 1987.
- LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 161–259, 1 jan. 1993.
- LLANOS-CUENTAS, A. et al. 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**, v. 28, n. 46, p. 7427–7435, 28 out. 2010.
- LOUSADA-DIETRICH, S. et al. A synthetic TLR4 agonist formulated in an emulsion enhances humoral and Type 1 cellular immune responses against GM22 - A GLURP-MSP3 fusion protein malaria vaccine candidate. **Vaccine**, v. 29, n. 17, p. 3284–3292, 2011.
- MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, jun. 2013.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 1 jan. 2014.
- MCMAHON-PRATT, D. et al. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against Leishmania infection. **Infection and immunity**, v. 61, n. 8, p. 3351–9, ago. 1993.
- MELBY, P. C. et al. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. **Infection and immunity**, v. 68, n. 10, p. 5595–602, out. 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 8 maio. 2019.
- MIRET, J. et al. Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime®) and the recombinant Leish-110f®+MPL-SE® vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 12, p. 1585–1594, 17 mar. 2008.
- MIYAKE, K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 3–10, fev. 2007.
- MIZEL, S. B.; BATES, J. T. Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 10, p. 5677–5682, 15 nov. 2010.
- MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–273, 2009.
- MORENO, J. et al. Immunization with H1, HASPB1 and MML Leishmania proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. **Vaccine**, v. 25, n. 29, p. 5290–5300, 20 jul. 2007.
- MUKHERJEE, A. K. et al. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 565–572, 2012.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 29 out. 2005.
- NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1464–1488, out. 2011.
- NASCIMENTO, E. et al. 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**, v. 28, n. 40, p. 6581–6587, 14 set. 2010.

- NETEA, M. G. et al. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 5, p. 749–755, 2004.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPS; 2019.
- OSPELT, C.; GAY, S. TLRs and chronic inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 4, p. 495–505, abr. 2010.
- PAES, W. et al. Recombinant polymorphic membrane protein D in combination with a novel, second-generation lipid adjuvant protects against intra-vaginal Chlamydia trachomatis infection in mice. **Vaccine**, v. 34, n. 35, p. 4123–4131, 2016.
- PALATNIK, C. B. et al. Inhibition of Leishmania donovani promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. **Infection and immunity**, v. 57, n. 3, p. 754–63, mar. 1989.
- PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191–1195, 2009.
- PARRA, L. E. et al. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2180–2186, 8 mar. 2007.
- PEREIRA-FONSECA, D. C. M. M. et al. Dog skin parasite load, TLR-2, IL-10 and TNF- α expression and infectiousness. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 11, p. e12493, nov. 2017.
- PICCININI, A. M.; MIDWOOD, K. S. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 1–21, 2010.
- PROBST, P. et al. A Leishmania protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor- α production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 10, p. 2634–2642, out. 1997.
- QURESHI, N. et al. Structure of the monophosphoryl lipid A moiety obtained from the lipopolysaccharide of Chlamydia trachomatis. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 16, p. 10594–600, 18 abr. 1997.
- RACHAMIM, N.; JAFFE, C. L. Pure protein from Leishmania donovani protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 6, p. 2322–31, 15 mar. 1993.
- RAFATI, S. et al. Identification of Leishmania major cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 113, n. 1, p. 35–43, mar. 2001.
- RAMAN, V. S. et al. Adjuvants for Leishmania vaccines: From models to clinical application. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–15, 2012.
- RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, ago. 2003.
- READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 7 jan. 2013.
- REED, S. G. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23–32, jan. 2009.
- REED, S. G.; BADARO, R.; LLOYD, R. M. Identification of specific and cross-reactive antigens of Leishmania donovani chagasi by human infection sera. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 138, n. 5, p. 1596–601, 1 mar. 1987.
- REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, 5 dez. 2013.
- REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec ® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233–2239, 2016.
- REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on Leishmania vaccines: A narrative review article. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2015.
- RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, n. C1, p. 1–12, 2018.
- RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 1 mar. 2016.
- ROSS, R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. **British medical journal**, v. 2, n. 2239, p. 1401, 28 nov. 1903.
- SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668–1679, nov. 2011.
- SCHEIERMANN, J.; KLINMAN, D. M. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. **Vaccine**, v. 32, n. 48, p. 6377–6389, 12 nov. 2014.
- SCHIJNS, V. E. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. **Current opinion in immunology**, v. 12, n. 4, p. 456–63, ago. 2000.

- SHIROTA, H.; KLINMAN, D. M. Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant. **Expert Review of Vaccines**, v. 13, n. 2, p. 299–312, 26 fev. 2014.
- SILVA, V. et al. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, v. 19, n. 9–10, p. 1082–1092, 8 dez. 2000.
- SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, p. 485–497, 2012.
- SKEIKY, Y. A. et al. A recombinant Leishmania antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. **The Journal of experimental medicine**, v. 181, n. 4, p. 1527–37, 1 abr. 1995a.
- SKEIKY, Y. A. et al. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of Leishmania species and humans. **Infection and immunity**, v. 63, n. 10, p. 4105–14, out. 1995b.
- SKEIKY, Y. A. et al. LeIF: a recombinant Leishmania protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 11, p. 6171–9, 1 dez. 1998.
- SKEIKY, Y. A. W. et al. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. **Vaccine**, v. 20, n. 27–28, p. 3292–303, 10 set. 2002.
- STEINHAGEN, F. et al. TLR-based immune adjuvants. **Vaccine**, v. 29, n. 17, p. 3341–55, 12 abr. 2011.
- TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 750, 2017.
- TOUSSI, D. N.; MASSARI, P. Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands. **Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 323–53, 25 abr. 2014.
- TUON, F. F. et al. Toll-like receptors and leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 866–872, 1 mar. 2008.
- ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, p. 1–17, 2017.
- VASILAKOS, J. P.; TOMAI, M. A. The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 7, p. 809–819, 9 jul. 2013.
- VEDVICK, T. et al. An Improved Manufacturing Process for a Recombinant Polyprotein Vaccine. **Biopharm International**, v. 21, 2 jan. 2008.
- VÉLEZ, I. D. et al. Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 2, p. 329–337, 11 dez. 2009.
- WEBB, J. R. et al. Molecular cloning of a novel protein antigen of Leishmania major that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 11, p. 5034–41, 1 dez. 1996.
- WEBB, J. R. et al. Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. **Infection and immunity**, v. 66, n. 7, p. 3279–89, jul. 1998.
- ZANIN, F. H. C. et al. **Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against Leishmania chagasi and Leishmania amazonensis experimental infections.** 2007.