

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Mestrado em Ciências da Saúde

Letícia Torres Dias

**ANIDRIDO DE HEMATINA NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL:
AVALIAÇÃO VACINAL**

São Paulo

2024

Letícia Torres Dias

**ANIDRIDO DE HEMATINA NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL:
AVALIAÇÃO VACINAL**

Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Tiemi Shio

São Paulo

2024

D532a

Dias, Leticia Torres.

Anidrido de hematina na leishmaniose experimental: avaliação vacinal / Leticia Torres Dias. – 2024.

60 p.: il.

Orientador: Profa. Dra. Marina Tiemi Shio.

Co-orientador: Prof. Me. André Luiz de Lacerda.

Dissertação. (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Santo Amaro, 2024.

Bibliografia incluída.

1. Leishmania. 2. Hemozoina. 3. Apresentação Cruzada de Antígenos. I. Shio, Marina Tiemi. II. Lacerda, Andre Luiz de. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

CDD 636.08969364

Letícia Torres Dias

**ANIDRIDO DE HEMATINA NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL:
AVALIAÇÃO VACINAL**

Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Mestre em Ciências da Saúde.
Orientadora: Profa. Dra. Marina Tiemi Shio.

São Paulo, 31 de janeiro de 2024

Banca Examinadora

Dra. Marina Tiemi Shio

Dr. Ryan Emiliano da Silva

Dr. Carlos Henrique C. Serezani

Conceito Final: _____

DEDICATÓRIA

Agradeço em primeiro lugar a minha família, amigos e todos aqueles que estiveram ao meu lado nesta jornada. À minha família, cujo amor e apoio incondicional foram meu alicerce, agradeço por serem minha fonte constante de inspiração. Cada vitória é de vocês tanto quanto é minha. É com imensa gratidão que dedico esta tese de mestrado a cada um de vocês, pilares fundamentais que sustentaram meu caminho ao longo destes desafiadores, porém enriquecedores, anos.

À minha orientadora, Marina Tiemi Shio, expresso minha profunda gratidão pela paciência, sabedoria e orientação dedicadas a cada passo deste trabalho. Suas contribuições foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e a isto sempre serei grata. Ao meu orientador durante meu breve intercâmbio, Leonardo da Silva Augusto, agradeço pela confiança depositada em mim, pelos desafios que me estimularam a ir além e pela sua presença constante como guia neste percurso e por me mostrar novamente o quão divertido a pesquisa pode ser.

As minhas parceiras de laboratório e amigas para a vida toda Rebeca Santana Souza e Ester Russo agradeço por me mostrarem empatia e solidariedade estando sempre ao meu lado e fazerem da minha pesquisa e dificuldades algo leve e descontraído.

À Universidade Santo Amaro, agradeço pelo ambiente propício à aprendizagem, pelas oportunidades de pesquisa e pela comunidade acadêmica que enriqueceu meu conhecimento. Ao corpo docente do meu mestrado, que compartilhou saberes, instigou questionamentos e proporcionou um ambiente intelectual estimulante, meu reconhecimento por sua contribuição essencial. À equipe do URC, cujo apoio técnico foi crucial para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço por todo suporte prestado.

Este mestrado representou não apenas uma etapa acadêmica, mas um período de intenso crescimento pessoal e profissional. Cada desafio superado, cada descoberta realizada, moldaram-me de maneiras que jamais poderia ter imaginado. Que esta tese seja não apenas um registro do meu trabalho, mas também um tributo a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o meu percurso.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa. À Universidade Santo Amaro (UNISA) e ao Centro de Pesquisa (URC) pela fundamental assistência institucional e de infraestrutura. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos financeiros concedidos através dos projetos 2021/01138-2 e 2022/16132-2, possibilitando a realização deste estudo. Ao Centro Médico da Universidade de Nebraska (UNMC) por sediar o intercâmbio de pesquisa (BEPE), e ao Dr. Leonardo da Silva Augusto pela orientação e apoio financeiro durante o BEPE. A Dr. Scott Bohle agradeço a colaboração na análise dos compostos. À Dra. Bartira Rossi-Bergmann pela doação da cepa *L. infantum*. A todo laboratório dos Drs. Sérgio Schenkman e Nobuko Yoshida pela autorização e auxílio no uso de suas instalações durante a síntese e análise dos compostos. Ao Dr. Jônatas Bussador do Amaral pela disponibilidade no uso das instalações e assistência durante a síntese e análise por citometria dos compostos. Agradeço a todos pela contribuição significativa para o sucesso deste projeto.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada de ampla distribuição global, sendo um problema de saúde pública mundial. No Brasil, a leishmaniose é causada principalmente pelas espécies *Leishmania (L) infantum chagasi*, *L. (L) amazonensis* e *L. (V) braziliensis* responsáveis pelas formas clínicas da leishmaniose visceral, cutânea que pode ser localizada ou difusa, e mucocutânea, respectivamente. O tratamento da leishmaniose ainda é um desafio devido ao alto custo de medicamentos, alta dose de droga, incidência e prevalência de resistência aos medicamentos. A pesquisa por novas opções de tratamento tem aumentado, assim como a busca por métodos mais eficazes no controle dos reservatórios animais da doença, como o a utilização de vacinas. Durante a síntese do cristal anidrido de hematina é possível acoplar substâncias nas lacunas entre os domínios de nanocristais, além de ser possível também, devido às suas propriedades anfifílicas, a incorporação destas substâncias no cristal já formado. O presente projeto propõe a utilização do anidrido de hematina ou hemozoina sintética acoplado ou revestido a antígenos de *Leishmania infantum* na ativação de linfócitos T CD8+ por meio da apresentação cruzada de antígenos um auxílio terapêutico e profilático para a leishmaniose experimental. Os resultados preliminares sobre a resposta vacinal mostraram que a sHz não foi capaz de agir como adjuvante em estratégia profilática, porém ela é capaz de carrear os antígenos sem interromper sua internalização, ainda a mesma foi capaz de estimular a apresentação cruzada de antígenos e diminuir o pH fagossomal de forma independente a catepsina B. Os resultados do projeto podem contribuir para a ampliação na imunoterapia da leishmaniose diminuindo, dessa forma, a transmissibilidade da doença.

Palavras-chave: *Leishmania*. Hemozoina. Apresentação cruzada de antígenos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease of wide global distribution, and it is considered a global public health problem. In Brazil, visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania (L) infantum chagasi*, *L. (L) amazonensis* and *L. (V) braziliensis*, responsible for the clinical forms of visceral leishmaniasis, cutaneous, which can be localized or diffuse, and mucocutaneous, respectively. Leishmaniasis treatment is still challenging due to high cost of drugs, high drug dose, incidence, and prevalence of drug resistance. The concern about new treatment options has increased, as well as the search for new methods, including vaccines, to control the disease in animal reservoirs. During the synthesis of the hemozoin anhydride crystal, it is possible to couple substances in the gaps between the nanocrystal domains, and given its amphiphilic properties, the incorporation of substances into the formed crystal is also feasible. The present study proposes the use of hemozoin anhydride or synthetic hemozoin coupled or coated with *Leishmania infantum* antigens in the activation of CD8⁺ T cells through cross-presentation as a therapeutic and prophylactic aid for experimental leishmaniasis. The preliminary results on the vaccine aspect showed that sHz was not able to function as an adjuvant in a prophylactic strategy; however, it can carry antigens without interrupting their internalization. Furthermore, it was able to stimulate cross-presentation of antigens and decrease the phagosomal pH independently of cathepsin B. Together, these findings reveal a potential contribution to the expansion of leishmaniasis immunotherapy, thus reducing the transmissibility of the disease.

Keywords: *Leishmania*. Hemozoin. Cross presentation.

Lista de Figuras

Figura 1 - Forma promastigota extracelular (A) e forma amastigota intracelular (B) de <i>Leishmania</i> spp.....	13
Figura 2- Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	15
Figura 3 - Ilustração esquemática da produção de hemozoina sintética.	31
Figura 4 - Síntese de Hz acoplada e revestida com OVA	32
Figura 5 – Síntese de Hz acoplada e revestida com sAgLi	33
Figura 6 - Colocalização da sHz no compartimento fagossômico de células dendríticas.	34
Figura 7 - Efeito da sHz acoplada e revestida a OVA sobre a atividade da catepsina B lisossômica	35
Figura 8 - Avaliação do pHrodo sobre sAgLi e sHz revestido e acoplado a ovalbumina	37
Figura 9 - Análise da expressão de H-2Kb/SIINFEKL em DCs tratadas com sHz revestido com peptídeo de OVA.....	38
Figura 10 - Avaliação da ativação de linfócitos T CD8+ via apresentação cruzada de antígenos.....	39
Figura 11 - Esquema de vacinação de camundongos BALB/c para profilaxia de leishmaniose visceral experimental	40
Figura 12 - Proliferação ex vivo de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados	41
Figura 13 - Carga parasitária nos órgãos de camundongos BALB/c imunizados	43

Lista de abreviaturas e/ou siglas

ALT	Alanina aminotransferase
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato aminotransferase
CCL12	Ligante de quimiocina 12
CCL2	Ligante de quimiocina 2
CCL3	Ligante de quimiocina 3
CCL4	Ligante de quimiocina 4
CCL7	Ligante de quimiocina 7
CD4+	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
cDCs	DCs convencionais
CLEC	Lectinas do tipo C
CXCL10	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 5</i>
CXCL5	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 5</i>
DCs	Células dendríticas
ER	Reticulo endoplasmático
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FcRs	Receptores de Fc
GP63	Glicoproteína de 63 kDa
HSPs	Proteínas de choque térmico
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1a	Interleucina 1 alfa
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4

IL-6	Interleucina 6
LC	Leishmaniose cutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP-9	Metaloproteinase-9
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NLRP3	<i>NLR Family Pyrin Domain Containing 3</i>
NO	Óxido nítrico
NOX2	NADPH oxidase 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
pDCs	DCs plasmocitoides
PGE2	Prostaglandina E2
sAgLi	Antígeno solúvel de <i>L. infantum</i>
sAgLiHzAco	Hemozoina sintética acoplada com antígeno solúvel de <i>L. infantum</i>
sAgLiHzRev	Hemozoina sintética revestida com antígeno solúvel de <i>L. infantum</i>
sHz	Hemozoina sintética
SNAREs	<i>Soluble NSF attachment receptor</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

VAMP8 *Vesicle Associated Membrane Protein 8*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Leishmaniose	12
1.1.1. <i>Morfologia, vetores e ciclo biológico</i>	13
1.1.2. <i>Epidemiologia</i>	15
1.1.3. <i>Estratégias terapêuticas</i>	16
1.1.4. <i>Estratégias vacinais</i>	17
1.2. Hemozoina sintética (sHz) ou anidrido de hematina como nanocarreador no auxílio terapêutico e vacinal	19
1.3. Apresentação cruzada de antígenos	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
4. METODOLOGIA	26
4.1. Culturas, infecção e obtenção do antígeno de <i>L. infantum</i>	26
4.2. Produção da Hemozoina sintética (sHz) revestida ou acoplada com OVA ou antígenos de <i>Leishmania</i>	26
4.3. Culturas e tratamento de células dendríticas e linfócitos	27
4.4. Proliferação celular e ELISA	27
4.5. Microscopia de imunofluorescência confocal	27
4.6. Atividade da catepsina B	27
4.7. Atividade do pHrodo	28
4.8. Expressão de H-2Kb/SIINFEKL	28
4.9. Infecção <i>in vivo</i> : Avaliação vacinal	28
4.10. Avaliação da densidade parasitária	29
4.11. Proliferação das células	29
4.12. Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada de ampla distribuição global, sendo um problema de saúde pública mundial. Os parasitas do gênero *Leishmania* ocasionam, de acordo com a espécie, formas clínicas que consistem basicamente em acometimento cutâneo, mucocutâneo e visceral. A última, a leishmaniose visceral, representa a forma clínica mais severa, sendo causada principalmente pela espécie *Leishmania infantum chagasi* no Novo e Velho Mundo e pela espécie *Leishmania donovani* no Velho Mundo. A leishmaniose visceral é caracterizada por um amplo espectro de manifestações clínicas que incluem febre, perda de peso e hepatoesplenomegalia, associados com achados laboratoriais como pancitopenia, diminuição da albumina devido a lesão hepática e hipergamaglobulinemia^{3,4}. Já a leishmaniose cutânea, que pode ser localizada ou difusa, é causada por diversas espécies, entre elas a *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, e a mucocutânea, causada principalmente pela *L. braziliensis*, está associada a danos parciais ou totais da mucosa oral, nasal e traqueal, bem como lesões ulceradas na pele, resultando em incapacidade grave e formação de cicatriz vitalícia^{4,5}. Estes parasitas são transmitidos por flebotomíneos que injetam as formas promastigotas durante o repasto sanguíneo. Os parasitas são injetados pela saliva do vetor e são fagocitados por neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Intracelularmente, as promastigotas se diferenciam em amastigotas, formas replicativas dos parasitas. Os macrófagos produzem várias moléculas microbidas como o óxido nítrico (NO) e Fator de Necrose Tumoral (TNF).⁶ No entanto, em macrófagos infectados a produção destes fatores anti-microbidas são inibidos por diversos mecanismos.⁷

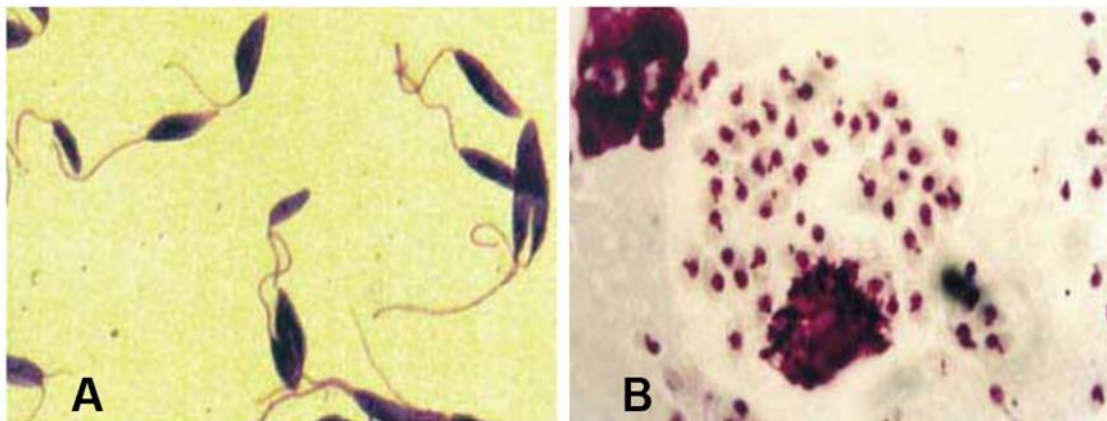
Atualmente, o tratamento para todos os tipos de leishmaniose é um grande desafio, sendo o mesmo limitado pela farmacoterapia à antimoniais pentavalentes, seguido de anfotericina B ou pentamidina, drogas de escolha secundária^{8,9}. Embora essa seja a farmacoterapia recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), eles possuem baixa eficiência, alto custo de manutenção, além de graves efeitos colaterais associados. Acima de tudo, um dado fundamental nesse tópico é a inexistência de vacinas adequadas para programas de imunização em massa no controle efetivo da leishmaniose visceral e cutânea. Sendo assim, é evidente a

necessidade da busca de novas estratégias terapêuticas e profiláticas, principalmente na área de vacinas, antígenos e adjuvantes capazes de atuarem conjuntamente na indução da resposta imune para a prevenção da consolidação da doença, assim como no controle de reservatórios animais que influenciam no aumento da incidência da doença em humanos.

1.1.1. Morfologia, vetores e ciclo biológico

O gênero *Leishmania* consiste em parasitas intracelulares com tropismo por células do sistema fagocitário. Possuem apenas duas morfologias como mostra a Figura 1, sendo a extracelular, promastigota, encontrada no trato gastrointestinal dos flebotomíneos vetores, forma caracterizada pela presença de flagelo livre, atuando como forma infecciosa em hospedeiros vertebrados (Figura 1A) e possui uma forma amastigota intracelular (Figura 1B), observada no interior das células fagocíticas do hospedeiro vertebrado infectado, em especial em macrófagos, sendo essa a forma infectante para os insetos vetores. ¹⁰

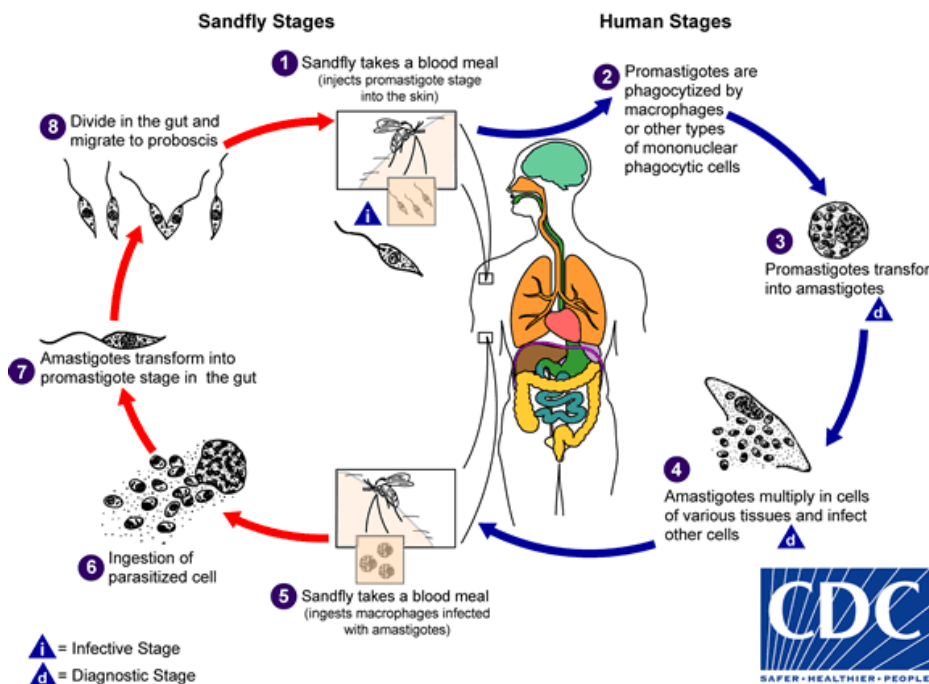
Figura 1 - Forma promastigota extracelular (A) e forma amastigota intracelular (B) de *Leishmania* spp.



Fonte: (Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2013 ¹⁰)

Psychodidae é um grupo constituído por mais de três mil espécies, espécies alocadas em seis subfamílias existentes e uma extinta. Em relação a relevância clínica, a subfamília Phlebotominae apresenta o maior interesse médico e veterinário pois inclui os vetores de patógenos para vertebrados, em especial para a leishmaniose, apresentando todas as espécies de vetores da doença em humanos e grande parte das espécies de vetores para outros mamíferos dentro dos gêneros *Phlebotomus* (hemisfério oriental) e *Lutzomyia* (Américas) ¹Como mostra a Figura 2, durante o repasto sanguíneo, o ciclo no hospedeiro vertebrado se inicia, onde fêmeas de flebotomíneos infectadas inoculam as formas promastigotas do parasita presentes em sua probóscide. Após entrada na corrente sanguínea do novo hospedeiro, as promastigotas são internalizadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear, onde permanecem e se transformam em amastigotas, a forma intracelular que se replica por divisão binária. Após o rompimento da célula infectada carregada com amastigotas, se inicia o processo de infecção de novas células fagocíticas e, nesse estágio, as manifestações clínicas da doença podem começar a tomar forma de acordo com a espécie do parasita inoculado pelo vetor e a resposta imune do hospedeiro. O ciclo no inseto vetor, o flebotomíneo, também se inicia durante o repasto sanguíneo, entretanto neste cenário o flebotomíneo irá se infectar pela ingestão de células infectadas com amastigotas, e no trato digestivo do vetor, essas se transformam em promastigotas novamente dando continuidade ao ciclo ^{9,10}.

Figura 2- Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: (Centers for Disease Control and Prevention, 2017)¹²

1.1.2. Epidemiologia

Esta doença negligenciada afeta principalmente populações pobres e com acesso limitado ao serviço básico de saúde, estando fortemente associada a problemas socioeconômicos. A epidemiologia da leishmaniose nas Américas é complexa, em grande parte devido a relação parasita-hospedeiro causada por múltiplas espécies circulantes em uma mesma região, além das mudanças ambientais.

Anualmente, a OMS estima 700.000 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose no mundo e em 2020, 97% dos casos de leishmaniose visceral (LV) nas Américas ocorreram no Brasil, entretanto, esta estimativa é imprecisa devido a subnotificação dos casos ^{13,14}. Em relação a LV, que pode ser fatal em mais de 95% dos casos se não tratada, estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos ocorram anualmente em todo o mundo, contudo, apenas 25 a 45% são relatados à OMS. Em 2020, os principais países a notificar a doença foram Brasil, China, Etiópia, Eritreia,

Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen. A manifestação mais comum de leishmaniose, apresentando anualmente cerca de 600.000 a 1 milhão de novos casos, é a leishmaniose cutânea (LC), que geralmente se manifesta com lesões de pele, ulceradas ou não, em partes expostas do corpo, com capacidade de gerar sequelas aos acometidos^{3,14}. As Américas apresentam cerca de 95% dos casos de LC notificados e, em 2020, mais de 85% dos novos casos de LC foram notificados em países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Líbia, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia. Já a leishmaniose mucocutânea que pode apresentar caráter desfigurante levando à destruição parcial ou total das mucosas apresentou mais de 90% dos casos em 2020 na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru .¹

1.1.3. Estratégias terapêuticas

Com relação ao tratamento da leishmaniose, no Brasil, o fármaco de primeira escolha para o tratamento em humanos, sem coinfeção, por exemplo, com o vírus da imunodeficiência adquirida, se faz por meio diferentes doses de antimoniato de N-metil glucamina que pode variar de 10 a 20 mg/kg/dia de acordo com a forma da doença⁸. Dentre outros medicamentos de segunda escolha, como anfotericina B lipossomal e Isotionato de pentamidina, estão presentes também a miltefosina e a paramomicina, sendo que, a miltefosina foi incorporada na rede pública para o tratamento oral da leishmaniose cutânea, além de ser o único medicamento permitido para o tratamento de leishmaniose visceral canina¹⁵, que são os reservatórios do parasita. Entretanto, o tratamento da leishmaniose ainda apresenta diversos desafios para os pacientes bem como, a atuação do medicamento no sítio da infecção. *Leishmania spp* são microrganismos intracelulares que possuem diversos mecanismos de evasão do sistema imune, dificultando assim a entrega das drogas em órgãos afetados, como o fígado, baço e medula óssea, bem como, dentro do fagolisossomo, onde o parasita se replica no interior de células fagocíticas. Em humanos, o tratamento da doença é limitado pelo custo, toxicidade e uso parenteral dos quimioterápicos atualmente disponíveis. Recentemente, várias pesquisas envolvendo nanopartículas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de melhorar a eficácia da entrega do fármaco e a diminuição dos efeitos tóxicos¹⁶⁻¹⁹.

A utilização de nanopartículas para a entrega de drogas apresenta vantagens em relação a quimioterapia convencional, como a liberação da droga no sítio de infecção de maneira controlada e sustentada, a diminuição do efeito sistêmico e a frequência de administração. Os fármacos de primeira escolha para o tratamento desta doença em humanos são medicamentos administrados via intramuscular ou endovenosa, o que pode causar reações adversas como a disfunção renal, hepática, pancreática ou cardíaca. O tratamento da leishmaniose ainda é um desafio devido ao alto custo de medicamentos, alta dose de droga, incidência e prevalência de resistência aos medicamentos. Assim, há a necessidade da pesquisa por novos sistemas de entrega dos medicamentos, principalmente para o ambiente intracelular, bem como a redução da dose visando diminuir sua toxicidade e efeitos colaterais associados, além de melhorar a sua atividade em meios com diferentes pH e a permeabilidade à membrana celular.

1.1.4. Estratégias vacinais

Desde a produção da primeira vacina com êxito por Edward Jenner em 1796, o desenvolvimento de vacinas progrediu na busca por maior segurança, tentando evitar ao máximo possíveis efeitos colaterais. Para aumentar a imunogenicidade faz-se necessário a utilização de adjuvantes que promovam a resposta imunológica celular de linfócitos T^{20,21}. Um mecanismo importante dos adjuvantes é a prolongação da exposição do antígeno às células dendríticas, induzindo sua maturação, além de ampliar o potencial imunogênico de antígenos fracos também aumenta a duração e velocidade da resposta imune, modula a especificidade e classe de anticorpos gerados, estimula a imunidade celular e de mucosas, amplificando, dessa forma, a resposta frente ao estímulo em indivíduos imunologicamente incompetentes, tendo o potencial de melhorar custo-benefício da formulação como um todo²². Evidências apontam que pacientes que se recuperaram de infecções por *Leishmania* spp. podem desenvolver imunidade à mesma, o que torna o desenvolvimento de vacinas efetivas contra a leishmaniose altamente plausível²³. Entretanto, atualmente não existem vacinas efetivas na proteção contra leishmaniose disponíveis para humanos. É descrito que vacinas que envolvem os dois principais perfis imunológicos, Th1 (*T helper 1*) e Th2 (*T helper 2*), são capazes de induzir respostas imunológicas de grande

efetividade e longa duração além de diminuir a necessidade de intervenção farmacológica²⁴. Até o presente momento, as abordagens verificadas para o desenvolvimento de vacinas contra *Leishmania* utilizam principalmente componentes e subunidades manipuladas do parasita associados, ou não, à adjuvantes imunomoduladores²⁵.

Existem diversos estudos promissores propondo vacinas para animais acometidos por leishmaniose, entretanto, as vacinas para uso humano seguem sem grandes resultados. Nesse aspecto, as vacinas licenciadas para o uso veterinário tomam frente no processo de prevenção da transmissibilidade zoonótica da doença para humanos²⁶. A vacina Leishmune® (Zoetis) à base do ligante de fucose-manose em conjunto com uma saponina adjuvante foi licenciada em 2003, porém devido a incapacidade de atender aos requisitos dos estudos de fase III teve sua formulação retirada do mercado em 2014²⁷. Outra vacina, a Leish-Tec® (Ceva Animal Health) que conta com uma proteína recombinante A2 e um adjuvante saponina, foi licenciada em 2007 e a mesma, atualmente, não possui mais permissão de uso comercial liberado para a leishmaniose visceral canina no Brasil^{27,28}. No entanto, na Europa, existem outras duas vacinas disponíveis licenciadas pela Agência Europeia de Medicamentos em 2011 e 2017, respectivamente, sendo elas a CaniLeish® (Virbac Animal Health), constituída por proteínas excretadas-secretadas purificadas de *Leishmania infantum* e pelo adjuvante saponina QA-21 e a vacina LetiFend® (Laboratórios LETI), que utiliza uma proteína Q quimérica recombinante sem o uso de adjuvante^{26,27}. É válido ressaltar que nenhuma dessas vacinas foram testadas quanto à sua eficácia contra a leishmaniose visceral humana, tornando seu uso limitado aos animais reservatórios da doença.

Apesar de não existirem, até o presente momento, vacinas para leishmaniose visceral licenciadas para o uso em humanos, autores como Osman *et al.*²⁹ atuam realizando ensaios com uma possível formulação, a vacina ChAd63-KH (ISRCTN07766359) atualmente em fase de testes clínicos em humanos³⁰, possivelmente capaz de atuar como uma opção para a leishmaniose visceral humana. A formulação desta vacina ChAd63-KH envolve a utilização de um adenovírus símio de replicação defeituosa que expressa um gene sintético (KH) capaz de codificar duas proteínas de *Leishmania donovani*, KMP-11 e HASPB, que estimulam de forma eficaz a ativação de células dendríticas e linfócitos T CD8 (*Cluster of differentiation 8*), induzindo a produção de IFN-g (Interferon-gama)²⁹.

1.2. Hemozoina sintética (sHz) ou anidrido de hematina como nanocarreador no auxílio terapêutico e vacinal

Durante a infecção por parasitas do gênero *Plasmodium*, cristais de hemozoina são produzidos como estratégia de sobrevivência intraeritrocitária para evitar a toxicidade que o grupamento heme presente na hemoglobina apresenta para estes parasitas. Sinteticamente, é possível obter a forma homóloga dos cristais produzidos pelo parasita, pigmento malárico ou hemozoina³¹.

Por meio de reações enzimáticas, sob um pH ácido entre 5,0 e 5,4, ocorre no vacúolo digestivo do protozoário a formação da hemozoina³². A mesma estrutura pode ser sintetizada à partir de hemina, sendo o cristal formado o anidrido de hematina. São descritos na literatura ao menos três métodos de sintetização distintos, com dimensões de cristais e tempo de síntese variados^{33,34}, sendo o protocolo com base em hemina em meio aquoso alcalino e com a adição controlada de solução ácida o mais adequado na produção de cristais com tamanho e morfologia análogos a forma nativa do cristal^{32,34}. Um dado importante a ser ressaltado é que durante a síntese do anidrido de hematina ocorre a formação de lacunas entre os domínios de nanocristais, onde é possível realizar o acoplamento de substâncias como drogas e antígenos.

Os cristais de hemozoina liberados na corrente sanguínea são rapidamente internalizados por células do sistema imune como macrófagos e células dendríticas (DCs), incitando a produção de mediadores pró-inflamatórios^{33,34}. Existem diversas propriedades imunomoduladoras descritas para a hemozoina, como a ativação da resposta imune de forma NF- κ B (fator nuclear kappa B) dependente relatada *in vitro* e *in vivo*³³, com regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 (interleucina 6), IL-1 β (Interleucina 1 beta) e IL-1 α (Interleucina 1 alfa) e quimiocinas como CCL2 (Ligante de quimiocina 2), CCL3 (Ligante de quimiocina 3), CCL4 (Ligante de quimiocina 4), CCL7 (Ligante de quimiocina 7), CCL12 (Ligante de quimiocina 12), CXCL5 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 5*) e CXCL10 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 10*), que desempenham um importante papel na quimiotaxia de leucócitos até o sítio de inflamação³⁵. Além disso, a internalização de hemozoina pelas células é descrita como potencializadora na expressão TNF- α dependente da metaloproteinase-9 (MMP-9) e, em leucócitos do sangue periférico, a hemozoina é capaz de suprimir a produção de PGE2 (Prostaglandina E2), o que indiretamente promove a inflamação

uma vez que a PGE2 regula negativamente o TNF- α ^{36,37}. Ainda, esse cristal é descrito na literatura por induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*), um complexo proteico citoplasmático, com consequente produção de uma importante citocina pró-inflamatória, a IL-1 β ³⁸.

O receptor de superfície da hemozoina foi descrito recentemente, a proteína transmembrana do tipo II CLEC12A, pertencente à família de lectinas do tipo C (CLEC), é expressa predominantemente por células que atuam na imunidade inata, como as DCs ³⁹⁻⁴¹. Anteriormente, Neumann *et al.* ⁴² havia demonstrado a capacidade que o receptor CLEC12A presente na membrana plasmática de DCs apresenta no reconhecimento de cristais de urato monossódico, bem como sua atuação na sinalização pela via Syk (*Spleen tyrosine kinase*), o que levantou a hipótese do mesmo ser capaz de também reconhecer os cristais de hemozoina. Tal hipótese foi confirmada recentemente por Raulf *et al.* ⁴³ em seu estudo com DCs CLEC12A ^{-/-} murinas onde não foi verificado o desenvolvimento de malária cerebral experimental após infecção por *Plasmodium berghei* ANKA, justamente por não haver o reconhecimento dos cristais de hemozoina, bem como a ativação de linfócitos T CD8 ⁺ responsáveis por essa manifestação clínica ⁴³. Ainda, o trabalho de Raulf *et al.* ⁴³ evidenciou que os cristais de hemozoina induzem a apresentação de antígenos fagocitados via MHC classe I, por meio da apresentação cruzada de antígenos nas DCs medulares.

Sendo assim, com base na literatura, é possível sugerir que o receptor CLEC12A, que reconhece o cristal hemozoina ⁴³ pode ser usado como uma ferramenta na estratégia de vacinação contra doenças infecciosas, utilizando a hemozoina como adjuvante, pois favorece a entrega de antígenos de diversas origens para às DCs na via de apresentação cruzada de antígenos, induzindo, dessa forma, a ativação eficiente de células T CD8 ⁻ no direcionamento à memória imunológica, como já observado por Wakim *et al.* ⁴⁴ para o antígeno da influenza ou por Hutten *et al.* ⁴⁵ para antígenos tumorais.

Recentemente, Lee *et al.* ⁴⁶ tem atuado na pesquisa acerca da utilização da hemozoina sintética como adjuvante em vacinas, assim como no aperfeiçoamento do tamanho dos cristais obtidos na técnica de sintetização. No entanto, até o momento, nenhum estudo ou patente explorou a apresentação cruzada de antígenos induzida pela hemozoina no contexto de vacina ou sua capacidade de nanocarrear drogas.

1.3. Apresentação cruzada de antígenos

No mecanismo clássico de apresentação de antígenos, aqueles advindos por fagocitose não têm acesso ao citoplasma para ser processado pelo proteossoma e apresentados via MHC (*Major histocompatibility complex*) classe I. Tais antígenos exógenos sofrem internalização em compartimentos endocíticos e são apresentados por moléculas do MHC classe II, dessa forma, ativando a resposta imune mediada por linfócitos T CD4⁺ (*Cluster of differentiation 4*). Em 1976, Bevan, *et al.* ⁴⁷ relatou pela primeira vez uma exceção a esse evento, onde foi observado que a linhagem de camundongos fêmeas [F1 (BALB/c × BALB.B)] inoculados com células congênicas alogênicas para antígenos de histocompatibilidade secundários originaram uma resposta imune mediada por linfócitos T citotóxicos (CD8) específicos para os antígenos secundários inoculados, sendo a apresentação desses antígenos realizada especificamente por moléculas do MHC classe I nas células hospedeiras ⁴¹. A geração dessa resposta nos linfócitos T citotóxicos, *in vivo*, foi denominada como apresentação cruzada de antígenos, processo que pode ser definido como a ativação de linfócitos T CD8⁺ *naive* por células apresentadoras de antígenos (APCs) que obtiveram esses antígenos através de processos fagocíticos ⁴⁷⁻⁴⁹.

A regulação da apresentação cruzada de antígenos pode envolver uma extensa variedade de mecanismos, entretanto, as bases moleculares de regulação desse evento permanecem sobre debate. Existem duas vias amplamente dissertadas na literatura que visam explicar como esse complexo processo ocorre, são elas, as vias endocítica e citosólica. A primeira, a via endocítica, é um seguimento em que proteases lisossomais, principalmente a catepsina S, presentes no compartimento endocítico, atuam no processamento das proteínas que foram apresentadas no MHC classe I. A segunda via, denominada via citosólica, é descrita como a via na qual os antígenos fagocitados sofrem translocação para o citosol e desta forma são processados via proteossoma. Outra via envolvida na transferência de antígenos do fagossomo para o citosol pode estar associada à ruptura do fagossomo (para revisão ^{49,50}).

Outra forma de apresentação cruzada de antígeno é pelo transporte do MHC classe I para o fagossomo. Dois mecanismos estão relacionados com a presença de MHC classe I no fagossomo, a primeira descreve que as moléculas de MHC classe I sintetizadas recentemente são transportadas do retículo endoplasmático (ER) para o

fagossomo⁵¹, através da fusão entre as dobras do ER com os fagossomos ou devido a formação de vesículas⁵². A segunda através da reciclagem endocítica^{53,54} que ocorre com algumas moléculas de MHC classe I carregadas com antígenos e todas as moléculas de MHC classe I não carregadas com antígenos são transportadas para endossomos tardios para sua degradação, entretanto, evidências apontam que alguns destes endossomos podem ser recarregados com peptídeos antigênicos e reciclados no endossomo tardio⁵⁵.

Entre as células apresentadoras de antígenos, as DCs são as que apresentam maior potencial no desencadeamento de uma resposta imune adaptativa durante infecções⁵⁶. Quando comparados aos macrófagos, os lisossomos das DCs apresentam um ambiente menos hostil que pode prevenir a rápida degradação de antígenos e, dessa forma, aumentar a probabilidade de apresentação cruzada de antígenos⁵⁷. Este fenômeno pode ser possível através da alcalinização ativada pela NADPH oxidase (Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) NOX2 (NADPH oxidase 2) dentro do fagossomo^{58,59}. A internalização de antígenos pode ocorrer por endocitose mediada por receptor, fagocitose e macropinocitose. Alguns receptores importantes para a endocitose são os receptores de complemento, receptores *scavengers*, receptores de Fc (FcRs), CLECs e proteínas de choque térmico (HSPs)⁶⁰⁻⁶³. Entretanto, apenas alguns subconjuntos específicos de DCs são descritos por facilitarem a apresentação cruzada de antígenos⁶⁴. As DCs são classificadas, de acordo com fatores de transcrição e receptores de superfície, em DCs plasmocitoides (pDCs), DCs mieloides ou DCs convencionais (cDCs)⁶⁵. Diversos subtipos de cDCs apresentam notável capacidade de apresentação cruzada de antígenos. Ainda, o receptor CLEC9A, presente em células dendríticas, atua incisivamente na apresentação cruzada de antígenos e é apontado em diversos estudos por seu papel fundamental no processo⁶⁶. A capacidade das DCs na apresentação cruzada de antígenos foi estudada em grande parte dos subtipos de DCs, entretanto, essa capacidade sofre limitações por certos fatores, como a rota do antígeno, sua constituição, além dos sinais que desempenham um papel na ativação de DCs para apresentação do antígeno às células T CD8^{+67,68}.

É relatado na literatura o papel essencial que as células dendríticas desempenham na interação com parasitas do gênero *Leishmania*, de modo que as DCs são apontadas por atuarem de forma determinante na evolução da infecção, onde a intrincada relação que ocorre entre as DCs e os parasitas podem resultar na

consolidação da infecção ou na arquitetura de uma resposta imune eficaz contra *Leishmania*⁶⁹. Ainda, uma vez ativadas, via reconhecimento de padrões moleculares pelos receptores de padrões repetidos, as DCs atuam como moduladoras da resposta imune adaptativa na leishmaniose e são elementos fundamentais na polarização dos subtipos de células T *helper* de acordo com as citocinas secretadas, assim como pelos processos de sinalização subjacentes⁷⁰. A relação entre *Leishmania* e DCs ocorre por meio da estimulação de vários mecanismos celulares de sinalização culminando em modificações fenotípicas e funcionais nessas células^{71,72}. Senso assim, essas modificações são de suma importância na síntese adequada de citocinas e na ativação dos subtipos de células Th1, com produção de citocinas como IFN- γ , que operam nos eventos imunológicos a caminho da resolução da infecção⁷³.

Visando a sobrevivência no fagossomo, esses parasitas contam com moléculas, como a metaloprotease GP63 (Glicoproteína de 63 kDa) e o lipofosfoglicano (LPG), capazes de interferir com o potencial microbicida da célula hospedeira⁷³. A literatura descreve a inibição da apresentação cruzada de antígenos como um mecanismo de evasão do sistema imune utilizados por *Leishmania* spp. e estudos apontam que a mesma consegue realizar tal processo pela clivagem de SNAREs (*Soluble NSF attachment receptor*), como VAMP8 (*Vesicle Associated Membrane Protein 8*), pela GP63, impedindo a atuação dessas moléculas na regulação de processos envolvidos na ativação da apresentação cruzada de antígenos^{73,74}. Como demonstrado por Brewig *et al.*⁷⁵ as DCs desempenham papel fundamental na ativação de linfócitos T tanto CD8⁺ quanto CD4⁺. O total impacto da participação das células T CD8⁺ em infecções por *Leishmania* spp. permanece inconclusivo, entretanto, com base nas evidências obtidas ao longo dos últimos anos é altamente sugestivo que as respostas protetoras dependem da ativação efetiva desses linfócitos mediada por células dendríticas^{76–78}.

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com os últimos levantamentos feitos pela OMS e Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o Brasil é o principal epicentro de leishmaniose nas Américas, doença que afeta principalmente as populações mais vulneráveis com acesso restrito a serviços básicos de saúde ^{1,8}.

Os cães (*Canis lupus familiaris*) estabelecem uma importante relação no ciclo biológico da leishmaniose devido a sua atuação como reservatórios do parasita em áreas urbanas, favorecendo a transmissão e manutenção da doença ao homem ²⁶. O controle da infecção em cães enfrenta múltiplos desafios seja pela existência de animais assintomáticos, amplo espectro de sinais clínicos ou pela baixa sensibilidade e especificidade no diagnóstico. Recentemente, foi realizada o licenciamento da droga leishmanicida miltefosina pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e o Ministério da Saúde, como alternativa a eutanásia dos animais infectados ¹⁵, entretanto, a mesma enfrenta desafios em relação a entrega efetiva da droga ao sítio alvo que precisam ser superadas ^{7,9}

Uma vacina ideal para leishmaniose visceral em cães deveria induzir uma resposta imune pró-inflamatória forte e duradoura, com predominância na expressão de citocinas do perfil Th1, como IFN- γ , e ativação de linfócitos T CD8+ via apresentação cruzada de antígenos, a fim de prevenir o estabelecimento inicial da infecção, ou controlar a progressão da mesma para o quadro grave, além de interromper o ciclo biológico do parasita nos cães vacinados caso sejam expostos novamente ao parasita ^{23,80}. Até pouco tempo atrás, a estratégia de vacinação em cães no Brasil contava com apenas uma possível candidata disponível comercialmente, a vacina Leish-Tec® licenciada em 2007, que utiliza a proteína recombinante A2 com o adjuvante saponina, e recentemente a mesma teve a sua suspensão pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) devido ao teor de proteína A2 abaixo do limite mínimo estipulado na Licença do Produto ^{28,81}, deixando claro a necessidade da formulação de novas opções no mercado ^{23,80,82}

Neste contexto, o presente projeto propõe avaliar a utilização do anidrido de hematina acoplado ou revestido ao antígeno solúvel de *L. infantum* na ativação de linfócitos T CD8+ por meio da apresentação cruzada de antígenos em células dendríticas, visando o auxílio profilático a leishmaniose experimental.

3. OBJETIVOS

Avaliar se o anidrido de hematina pode funcionar como um nanocarreador e adjuvante na apresentação cruzada de antígenos de *Leishmania infantum* auxiliando na profilaxia da leishmaniose experimental.

Mais especificamente:

a) Avaliar *in vitro* o anidrido de hematina acoplado (antígenos adicionados na produção do cristal) ou revestido (antígenos adicionados após o cristal estar pronto) com ovalbumina ou antígenos solúveis de *L. infantum* em células dendríticas da linhagem DC2.4;

b) Verificar *in vivo* e *ex vivo* se o anidrido de hematina acoplado ou revestido com os antígenos solúveis de *L. infantum* pode funcionar como adjuvante na imunização contra a leishmaniose visceral.

4. METODOLOGIA

Reagentes quando não mencionados a fonte, foram obtidos comercialmente da Sigma Aldrich.

4.1. Culturas, infecção e obtenção do antígeno de *L. infantum*

Parasitas da espécie *L. infantum* (MHOM/BR/2005/NLC) foram doados pela Dra. Bartira Rossi Bergmann (UFRJ). Os parasitas foram mantidos em meio 199 (Invitrogen) completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 mg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 4% de urina e 10 mg/mL de hemina), com passagem para um novo meio a cada 3 ou 4 dias. As formas promastigotas, na fase estacionária de crescimento, foram utilizadas para a infecção *in vivo* 10 promastigotas foram administradas intravenosamente⁷⁹. Para obtenção dos antígenos dos parasitas, os parasitas na fase estacionária foram centrifugados, lavados com salina tamponada (PBS), congelados e descongelados (10 ciclos). A concentração de proteína foi determinada com o reagente de Bradford (Bio-rad), conforme instruções do fabricante. Os antígenos de *Leishmania* foram misturados com o tampão de amostra de SDS-PAGE (Tris 62 mM pH 6,8, glicerol 10 %, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 5 % e azul de bromofenol 0,01 %). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE. Em seguida, o gel foi submetido à coloração de prata para analisar as proteínas.

4.2. Produção da Hemozoina sintética (sHz) revestida ou acoplada com OVA ou antígenos de *Leishmania*

A sHz foi gerada utilizando o método rápido⁸³, no qual 100 mL de NaOH (0.1 M) foi degaseificado em nitrogênio por 30 min e depois a hemina (0,8 mmol; 521,6 mg) foi adicionada e mantida sob agitação por 30 min para ser dissolvida. A solução foi ajustada para o pH 4, utilizando ácido propanoico. Para geração da sHz acoplada, diferentes concentrações de lisado dos parasitas (1 – 4 mg) ou OVA (25 mg), foram adicionadas na fase em que o pH estava próximo do neutro, posteriormente o frasco foi transferido para o banho de óleo (70 °C) sob agitação por 18 h. Cristais pretos (amórficos) foram obtidos. Depois da centrifugação em temperatura ambiente (7000 rpm/1 h), os cristais foram lavados 3 vezes por 3 h com NaHCO₃ (0.1M) e a cada lavagem com NaHCO₃ foi intercalada uma lavagem com água. Os cristais foram secos

em estufa de secagem por 18 h. Para gerar a sHz revestida, os cristais de sHz foram incubados 30 min com lisado dos parasitas ou OVA, lavados e utilizados para os experimentos. A presença das proteínas na sHz foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida seguido pela coloração de prata.

4.3. Culturas e tratamento de células dendríticas e linfócitos

As células dendríticas de linhagem celular DC2.4 ou linfócitos CD8 (RF33.70) e CD4⁺(MF2.2D9) foram mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com HEPES 20 mM, soro fetal bovino 10% (Invitrogen), bicarbonato de sódio 11 mM, L-glutamina 2 mM, 100 mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (meio completo). Com passagem a cada 48 h e incubação a 37 °C e 5% de CO₂.

4.4. Proliferação celular e ELISA

As células dendríticas (linhagem DC2.4), 5x10⁵ células/500µL, foram incubadas ou não com OVA, sHz acoplada ou revestida a OVA. A seguir, as células foram lavadas com PBS e co-cultivadas com linfócitos, 5x10⁵ células/500µL, marcados ou não com corante fluorescente CFSE (10 mM por 15 min). Foram utilizados linfócitos de linhagem RF33.70 ou MF2.2D9. A co-cultura foi mantida por 3-5 dias, seguido da análise por citometria de fluxo, em colaboração com a Profa. Dra. Carolina Nunes França, UNISA/UNIFESP.

4.5. Microscopia de imunofluorescência confocal

Células dendríticas (DC2.4) foram tratadas com sHz acoplado ou revestido com sAgLi ou ovalbumina por 1 hora. As lamelas foram fixadas com 2% de paraformaldeído (Canemco e Mirvac) por 20 minutos, lavadas três vezes em PBS, seguidas de uma incubação de 1 hora com anticorpo LAMP-1 (Alexa Fluor 568 anti-rato; Molecular Probes) em Buffer de Bloqueio de Imunofluorescência (Cell Signaling) e montadas em lâminas de vidro com ProLong com DAPI™. As imagens foram capturadas usando um microscópio confocal de disco giratório Nikon CSU-W1 (objetiva de imersão em óleo de 60X). O processamento de imagens e procedimentos analíticos subsequentes foram realizados usando o ImageJ (Fiji).

4.6. Atividade da catepsina B

Células dendríticas (DC2.4) foram cultivadas em lâminas μ -Slides VI0.4 da ibidi a uma densidade de 1×10^4 células por canal. Posteriormente, as células foram tratadas com sHz revestido ou acoplado a ovo e ovalbumina 30 minutos antes da marcação com Magic Red (Cat. 937; ImmunoChemistry Technologies; Bloomington, MN). O corante foi inicialmente dissolvido em 50 μ L de DMSO, misturado por vortex e mantido a -20°C . Logo antes da aplicação, a solução inicial foi diluída em um fator de 10 com água estéril e, em seguida, diluída em um fator de 25 em meio RPMI completo, seguido por um período de incubação de 30 minutos a 37°C sob 5% de CO_2 . A captura de imagens de lisossomas individuais foi realizada usando um microscópio confocal de disco giratório Nikon e mantendo configurações de captura consistentes. A intensidade da fluorescência do Magic Red foi quantificada e subsequentemente normalizada para a área respectiva. Cada condição foi avaliada medindo pelo menos 20 células. O processamento de imagens e os procedimentos analíticos subsequentes foram realizados usando o ImageJ (Fiji).

4.7. Atividade do pHrodo

Células dendríticas (DC2.4) foram cultivadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^5 células/poço. Após 24 horas, as células foram carregadas com o dextrano pHrodo e tratadas com sHz revestido ou acoplado a ovo ou sAgLi, sAgLi e ovalbumina por 1 hora a 37°C sob 5% de CO_2 . As células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6).

4.8. Expressão de H-2Kb/SIINFEKL

Células dendríticas (DC2.4) foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^5 células/poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com sHz revestido com SIINFEKL, veículo vazio de sHz, SIINFEKL ou a última lavagem (LW) de sHz revestido com SIINFEKL por 24 horas a 37°C sob 5% de CO_2 . As células foram coletadas, marcadas com anti-H-2Kb/SIINFEKL e analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6).

4.9. Infecção *in vivo*: Avaliação vacinal

Todos os experimentos foram realizados com camundongos BALB/c fêmeas, com 6-8 semanas de idade e 25-30 g de peso corporal, obtidas no biotério central da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME).

Para imunização: Grupos de animais foram imunizados, no dia 0, 14 e dia 28, subcutaneamente com apenas a melhor dose de cada composto determinada em um experimento anterior e com base em literatura prévia⁸³ onde para sHz foram utilizados 100 µg/camundongo e para Alum 2 mg/camundongo, formando 7 grupos de imunização, sendo eles: PBS, sHz, sAgLi, sAgLiHzAco, sAgLiHzRev, Alum e sAgLiAlum. Sabe-se que a administração subcutânea com hemozoina sintética com ou sem antígenos foi seguramente testada em camundongos, ratos, cachorros e primatas. Já a toxicidade foi testada em ratos com até cinco repetições de injeção subcutânea de 8 – 800 mg/kg/rato ou uma injeção de 910 mg/kg/rato de acordo com as boas práticas de laboratório para testes de segurança não clínicos do Japão. Estas doses foram bem toleradas, não causaram morte ou mudança no comportamento dos animais. A maior dose pode causar uma inflamação local com auto resolução em uma semana⁴⁶ Após 14 dias da última imunização os camundongos foram infectados por via peritoneal com 10⁷ de *L. infantum* em 500 µL de PBS. Após 21 dias da infecção os animais foram sacrificados por anestésico inalatório. O impacto da imunização foi avaliado na diminuição da carga parasitária do fígado e baço do camundongos. As células esplênicas foram desafiadas *in vitro* para avaliar a resposta dos linfócitos T CD4 ou CD8 positivos, através dos ensaios de proliferação e perfil de citocinas produzidas.

4.10. Avaliação da densidade parasitária

Para a diluição limitante, quantidades equivalentes dos órgãos fígado e baço foram macerados em 1 e 6 mL de PBS, respectivamente, e foi feita a diluição seriada (fator 2) dos mesmos em meio 199 completo, após 20 dias de incubação a 28 °C foi feita a leitura por microscopia ótica comum da diluição limitante. O fator de diluição foi determinado como o último poço onde foi observado a presença de promastigotas¹⁶

4.11. Proliferação das células

Os baços foram macerados em PBS/FBS 1%. Após a centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de solução de lise de hemácias (9 partes de NH₄Cl – 8,5

$\mu\text{g/mL}$ para 1 parte Tris – $20 \mu\text{g/mL}$) e incubado por 5 minutos. Seguindo pela adição de 10 mL de PBS. As células esplênicas foram lavadas com PBS/FBS 1%, marcadas ou não com corante fluorescente CFSE ($10 \mu\text{M}$ por 15 min), e foram incubadas (2×10^5 células/ $500 \mu\text{L}$) ou não com diferentes concentrações do sAgLi (5, 10 e $20 \mu\text{g}$), ou sAgLiHzRev (50 – $200 \mu\text{g/mL}$) e sAgLiHzAco (5, 10 e $20 \mu\text{g}$ em $100 \mu\text{g/mL}$ de sHz) por 72 h. Os esplenócitos foram marcados com anti-CD8 (Biolegend) ou anti-CD4 (Novus Biologicals) conjugados com PE, e analisados por citometria de fluxo (BD Accuri C6).

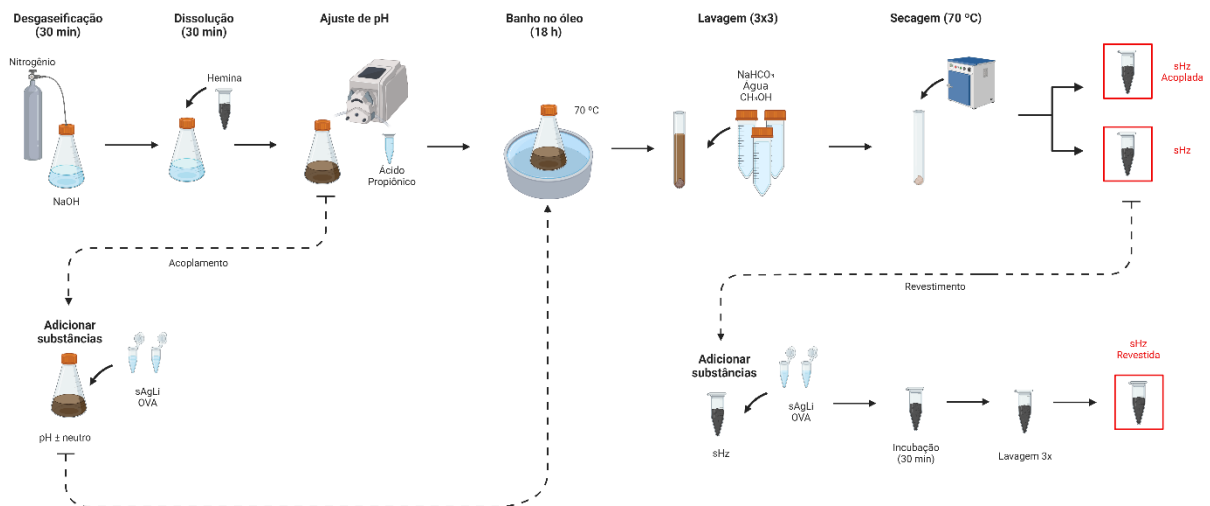
4.12. Análises estatísticas

Os dados foram apresentados valores médios com os respectivos desvios padrão de um mínimo de três experimentos biológicos independentes. A significância estatística foi avaliada por meio de análise de variância (ANOVA), seguindo o teste de Tukey, utilizando o *software* Graph Prism 10, e o coeficiente de correlação de Pearson usando o *software* Fiji ImageJ (P 0,05).

5. RESULTADOS

A produção de sHz foi feita conforme ilustrado no esquema (Fig. 3) e descrito acima nos métodos.

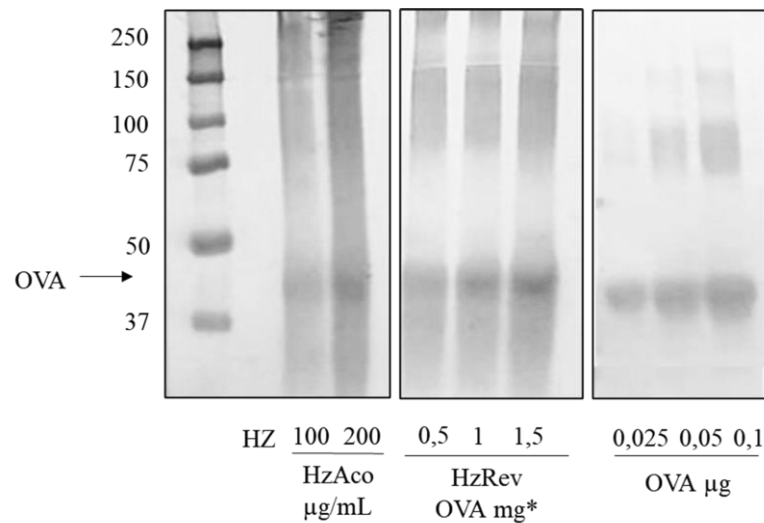
Figura 3 - Ilustração esquemática da produção de hemozoina sintética.



A produção de hemozoina sintética (sHz) foi conduzida utilizando o método rápido⁸³. Para o acoplamento, os antígenos, ovalbumina e sAgLi, foram adicionados durante a síntese dos cristais de sHz em um pH próximo a 7 (neutro) para gerar cristais monodispersos. Para o revestimento, a sHz sintetizado foi incubado com concentrações variadas de antígenos, após uma incubação de 30 minutos o cristal foi lavado.

Inicialmente, a padronização do uso de hemozoina como adjuvante na estimulação da apresentação cruzada de antígenos *in vitro* foi feita utilizando como antígeno proteico a ovalbumina (OVA). Após síntese, como já descrito anteriormente (Fig. 3), foi realizada a análise via SDS-PAGE em gel de poliacrilamida das hemozoinas revestidas ou acopladas a OVA, onde foi observado a presença de proteínas na Hz, tanto acoplada, quanto revestida, utilizando diferentes concentrações de OVA (0,5, 1 e 1,5 mg em 100 µg/mL de sHz (Figura 4). Para o acoplamento, a OVA (25 mg de OVA:150 mg de hemina) foi adicionada durante a síntese dos cristais de sHz, em um pH próximo a 7 (neutro), para gerar cristais monodispersos.

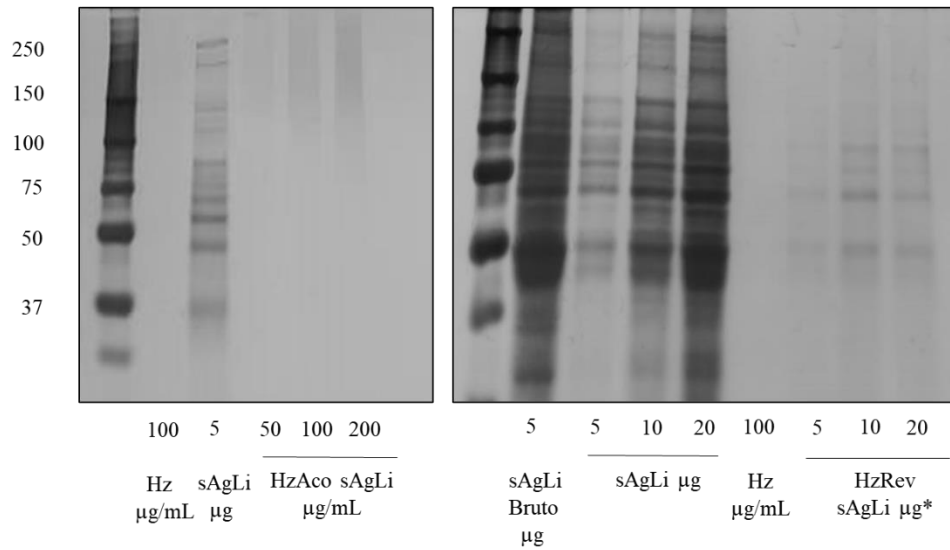
Figura 4 - Síntese de Hz acoplada e revestida com OVA



A figura mostra a determinação da presença das proteínas na sHz via SDS-PAGE em gel de poliacrilamida seguido pela coloração de prata. Ovalbumina possui peso molecular de 45 kDa como indicado pela seta. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados de forma independente. - *mg de OVA em 100 µg/mL de sHz.

Após a padronização da produção de hemozoina acoplada ou revestida com OVA, foi realizado o acoplamento ou revestimento do cristal com sAgLi. Foram produzidos 5 lotes de hemozoina acoplada ao sAgLi em diferentes concentrações (1 – 4 mg) obtidos de diferentes formas (congelado/descongelado sonicado, congelado/descongelado não sonicado e detergente). Como representado na Figura 5, a detecção das proteínas na sHz sintetizada nos lotes de acoplamento, independente das concentrações utilizadas (50, 100 e 200 µg/mL), via SDS-PAGE com coloração de prata apresenta bandas de difícil visualização. Em contrapartida, o revestimento dos cristais com os antígenos foi detectável visualmente nas concentrações de 5, 10 e 20 µg de sAgLi em 100 µg/mL de hemozoina (Fig. 5).

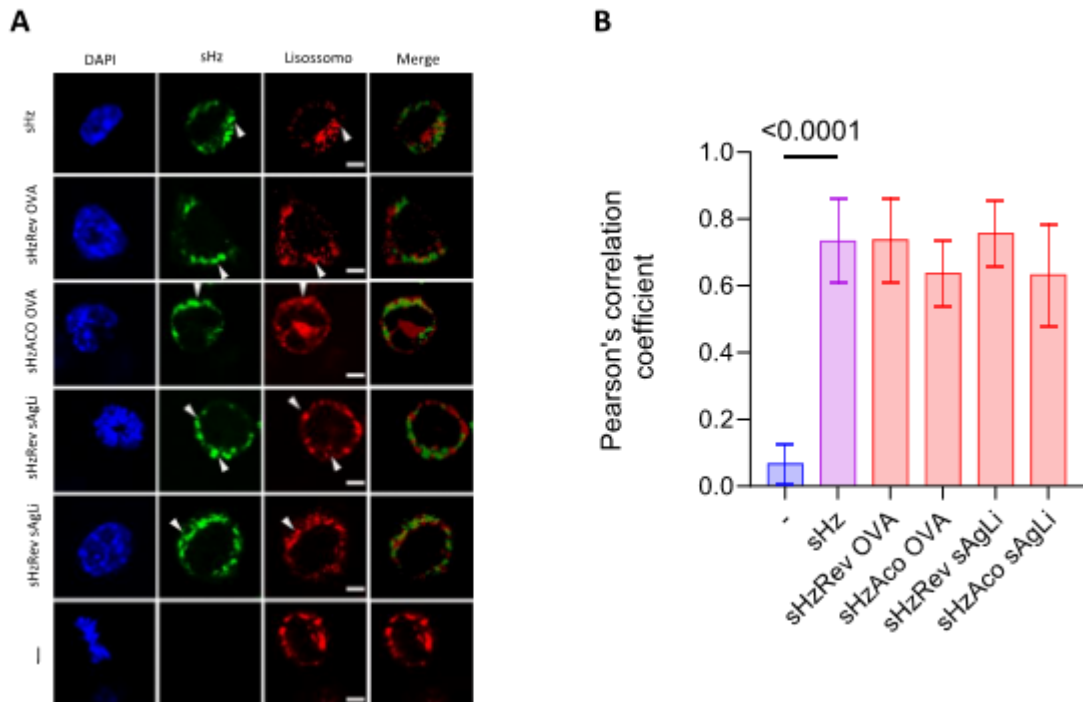
Figura 5 – Síntese de Hz acoplada e revestida com sAgLi



A figura mostra a determinação da presença das proteínas na Hz via SDS-PAGE em gel de poliacrilamida seguido pela coloração de prata. Os resultados são representativos de cinco lotes e experimentos realizados de forma independente. - *µg de sAgLi em 100 µg/mL de Hz.

Para determinar a localização intracelular dos cristais, utilizamos a microscopia confocal para observar células dendríticas tratadas com sHz revestido ou acoplado com antígenos de *Leishmania infantum* ou ovalbumina.

Figura 6 - Colocalização da sHz no compartimento fagossômico de células dendríticas.



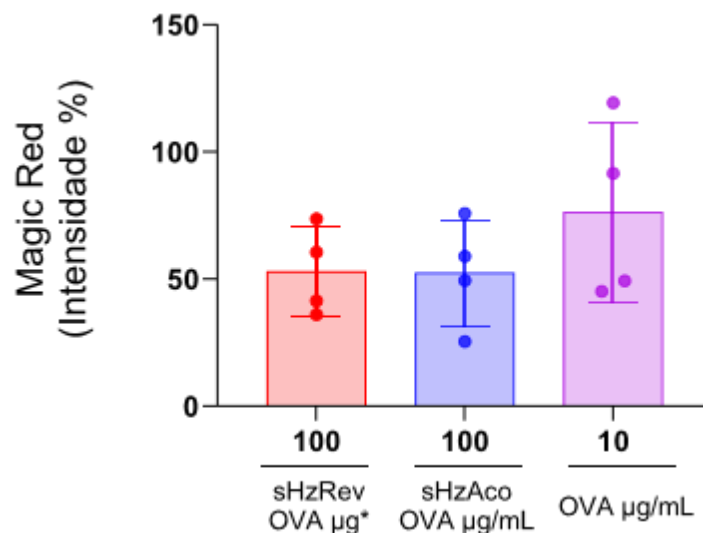
Células dendríticas foram tratadas com sHz acoplado ou revestido com sAgLi ou ovalbumina por 1 hora. As lamínulas foram fixadas com paraformaldeído a 2% (Canemco e Mirvac) por 20 minutos, lavadas três vezes em PBS, seguidas de uma incubação de 1 hora com anticorpo LAMP-1 (Alexa Fluor 568 anti-rato; Molecular Probes) em Buffer de Bloqueio de Imunofluorescência (Cell Signaling) e montadas em lâminas de vidro (ProLong com DAPI™). As imagens foram capturadas usando um microscópio confocal de disco giratório Nikon CSU-W1 (objetiva de imersão em óleo 60X). A análise foi realizada em lamínulas duplicadas de um único experimento. A co-localização (setas) foi analisada usando o Fiji e o coeficiente de Pearson (n= 50 células), utilizando as células não tratadas (-) e sHz pura como controle para comparação de co-localização entre sHz acoplado ou revestido com sAgLi ou ovalbumina (P= 0.05).

As imagens imunofluorescentes (Figura 6A) indicam a co-localização dos cristais com o compartimento fagossomal (LAMP1-positivo). As setas na Figura 6A enfatizam a co-localização da sHz dentro dos fagossomas das DCs. Nossas descobertas destacam a presença de cristais de sHz dentro dos fagossomas após uma hora de tratamento. Para quantificar essa co-localização, aplicamos o coeficiente de Pearson⁸⁴, permitindo-nos avaliar quantitativamente a extensão da co-localização entre sHz (canal verde) e LAMP-1 (canal vermelho) nos fagossomas dessas células.

A análise estatística usando o coeficiente de Pearson (Figura 6B) proporciona uma visão intrigante da interação sHz-fagossoma. A comparação entre sHz vazio e sHz acoplado ou revestido com antígenos não revela diferença significativa na co-localização de cristais. Isso sugere que os processos de acoplamento e revestimento não perturbam ou interferem nesse aspecto da interação entre a hemozoina sintética e os fagossomas.

Em nossa investigação, analisamos o papel do pH lisossômico, um determinante crítico da eficiência de processamento e apresentação de antígenos, especialmente no que diz respeito à apresentação cruzada de antígenos^{58,85-88}. Nosso foco estava na compreensão do metabolismo lisossômico e acidificação após o tratamento com sHz. Para avaliar a capacidade moduladora do pH de sHz, utilizamos o ensaio colorimétrico Magic Red, monitorando a intensidade de fluorescência da atividade proteolítica de catepsina B lisossômica em células tratadas com sHz (Figura 7).

Figura 7 - Efeito da sHz acoplada e revestida a OVA sobre a atividade da catepsina B lisossômica

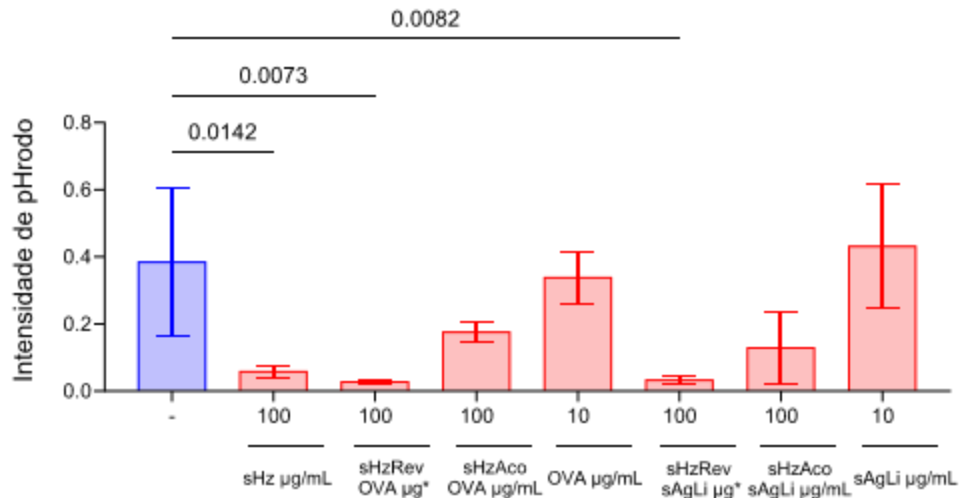


Células dendríticas (DC2.4) foram cultivadas em lâminas μ -Slides VI0.4 da ibidi a uma densidade de 1×10^4 células por canal. Posteriormente, as células foram tratadas com sHz revestido ou acoplado com OVA por 30 minutos antes da marcação com Magic Red (Cat. 937; ImmunoChemistry Technologies; Bloomington, MN). Células não tratadas e sHz pura foram usados como controles. O corante foi inicialmente dissolvido em 50 μ l de DMSO, misturado

por vortex e armazenado a -20°C . Pouco antes da aplicação, a solução estoque inicial foi diluída em um fator de 10 com água estéril e, em seguida, diluída adicionalmente em um fator de 25 em meio de cultura RPMI completo, seguido por um período de incubação de 30 minutos a 37°C sob 5% de CO_2 . *Live cell image* de lisossomos individuais foi conduzida usando um microscópio confocal de disco giratório Nikon, mantendo configurações de captura consistentes. A intensidade da fluorescência do Magic Red foi quantificada e posteriormente normalizada para a área respectiva. Cada condição foi avaliada medindo pelo menos 20 células, e essa análise foi realizada em duplicata em quatro experimentos independentes. O processamento de imagem e os procedimentos analíticos subsequentes foram conduzidos usando o software ImageJ (Fiji) e o GraphPad Prism 10 para *One-Way* ANOVA (P 0.05). $^*\mu\text{g}$ de ovalbumina em 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sHz.

O substrato de detecção do Magic Red, permeável às membranas celulares, utiliza um fluoróforo vermelho ligado a peptídeos-alvo da catepsina B⁸⁹. Após a atividade e clivagem da catepsina B, ele emite fluorescência vermelha, com intensidade aumentando conforme a atividade enzimática progride^{89,90}. Dada a influência positiva do pH ácido no fagossoma na atividade da catepsina B^{91,92}, comparamos a intensidade do Magic Red entre células tratadas com sHz acoplado e revestido com OVA e células tratadas com OVA pura. Células não tratadas e sHz pura serviram como controles para OVA e sHz acoplado ou revestido, respectivamente. Os resultados revelaram uma redução não significativa na intensidade de fluorescência do Magic Red em células tratadas com sHz (Figura 7), sugerindo que a hemozoina sintética pode não interferir significativamente na atividade da catepsina B, embora tenha reduzido sua atividade em cerca de 25%.

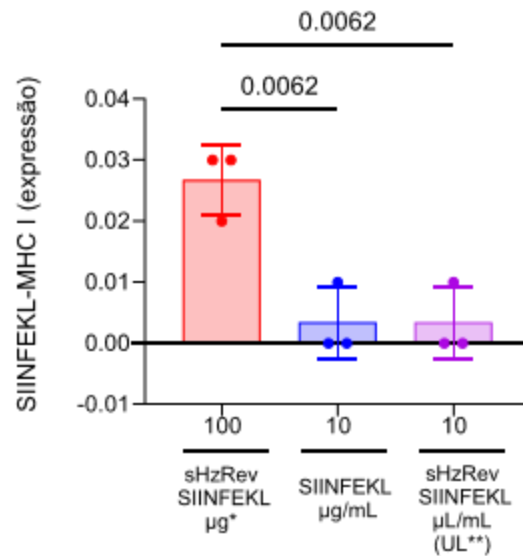
Figura 8 - Avaliação do pHrodo sobre sAgLi e sHz revestido e acoplado a ovalbumina



Células dendríticas (DC2.4) foram cultivadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^5 células/poço. Após 24 horas, as células foram carregadas com o dextrano pHrodo e tratadas com sHz pura, sHz revestido ou acoplado com OVA ou sAgLi, sAgLi e OVA por 1 hora a 37°C sob 5% de CO₂. Células não tratadas foram usadas como controles. As células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6). A análise foi realizada em duplicata em três experimentos independentes. Os procedimentos analíticos foram conduzidos usando o software GraphPad Prism 10 para *one-way* ANOVA (P 0.05). *µg de ovalbumina ou sAgLi em 100 µg/mL de sHz.

Posteriormente, empregamos o ensaio de pHrodo Dextran⁹³ (Figura 8) para investigar a dinâmica do pH lisossômico em DCs durante diferentes condições experimentais, incluindo tratamento com sHz acoplado e revestido com sAgLi ou ovalbumina, sAgLi sozinho ou ovalbumina sozinha. Esse ensaio, utilizando fluoróforos sensíveis ao pH, mede variações de pH em resposta a condições experimentais. A intensidade da fluorescência do pHrodo foi significativamente reduzida em células tratadas com sHz, sHz revestido com sAgLi ou OVA, conforme indicado pela análise de citometria de fluxo (Figura 8). Esses achados sugerem que o sHz pode reduzir o pH dos fagossomos por meio de uma via alternativa que pode não estar relacionada à catepsina B.

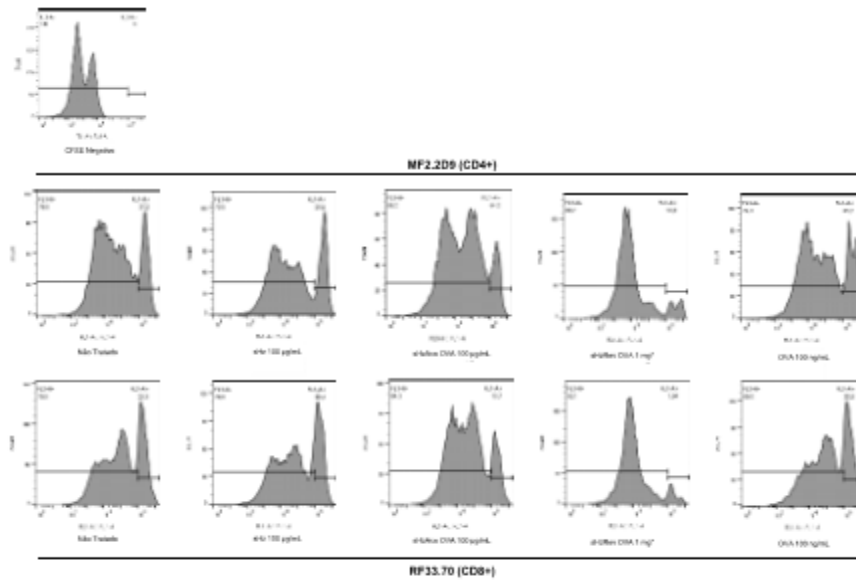
Figura 9 - Análise da expressão de H-2Kb/SIINFEKL em DCs tratadas com sHz revestido com peptídeo de OVA



Células dendríticas (DC2.4) foram cultivadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^5 células/poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com sHz revestido com SIINFEKL, última lavagem de sHz revestido com SIINFEKL, sHz pura, e SIINFEKL por 24 horas a 37°C sob 5% de CO₂. Células não tratadas e sHz pura foram usados como controles. As células foram coletadas, marcadas com anti-H-2Kb/SIINFEKL e analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri C6) e GraphPad Prism 10. A análise foi realizada em duplicata em três experimentos independentes (*one-way* ANOVA $P=0.05$). *µg de SIINFEKL ou ova 323-339 em 100 µg/mL de sHz. (UL**) sobrenadante da última lavagem de sHz revestido com SIINFEKL.

Prosseguindo, iniciamos a exploração da apresentação cruzada ao avaliar a expressão de H-2Kb/SIINFEKL em DCs tratadas com sHz revestido com SIINFEKL (Figura 9). Os controles incluíram sHz pura, células não tratadas e peptídeos SIINFEKL sozinhos. Os resultados demonstraram uma variação positiva na expressão de H-2Kb/SIINFEKL em DCs após o tratamento com sHz revestido com SIINFEKL, indicando a ocorrência da apresentação cruzada. O peptídeo SIINFEKL sozinho também é capaz de se ligar ao receptor MHC classe I, provavelmente por ligação direta⁹⁴, então também testamos essa ligação direta usando o sobrenadante da última lavagem (UL**) no protocolo de revestimento da sHz para tratar as DCs, e isso não aumentou a expressão de H-2Kb/SIINFEKL (Figura 9).

Figura 10 - Avaliação da ativação de linfócitos T CD8+ via apresentação cruzada de antígenos

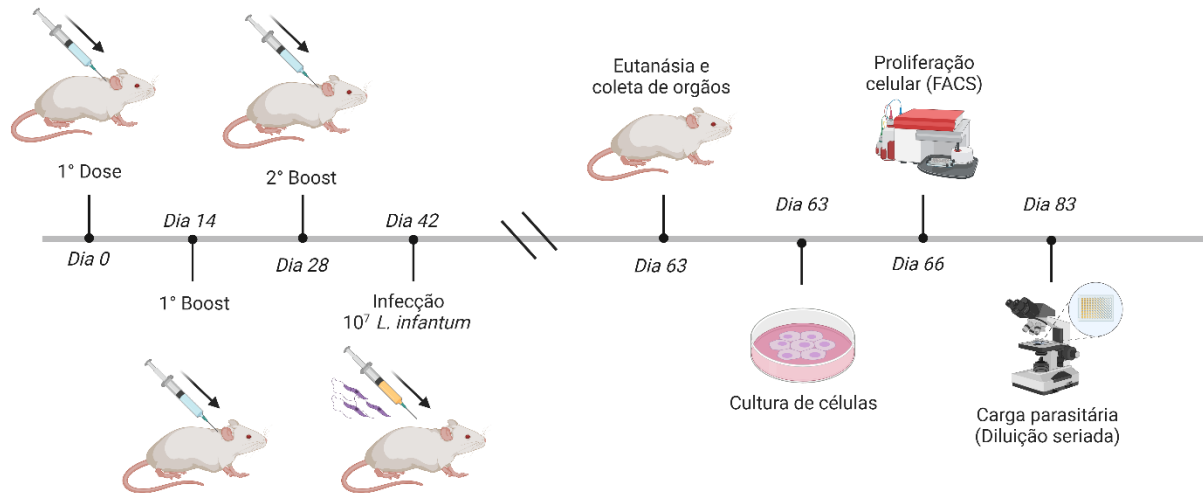


Células dendríticas (DC2.4) a 5×10^4 células/500 μ L tratadas com diferentes concentrações de sHz acoplado ou revestido a OVA e linfócitos (MF2.2D9 e RF33.70) 5×10^4 células/500 μ L marcados com CFSE (10 μ M) foram co-cultivados e analisados por FACS (BD Accuri C6). Os dados na figura mostram a avaliação representativa da ativação de células T CD8+ por meio da apresentação cruzada. *mg de OVA em 100 μ g/mL de sHz.

Em seguida (Figura 10), para validar a apresentação cruzada, as células dendríticas foram tratadas com hemozoina sintética acoplado e revestido com ovalbumina e co-cultivadas com linhagens de linfócitos CD4+ e CD8+ capazes de responder a epítomos específicos do antígeno ovalbumina (MF2.2D9 e RF33.70, respectivamente)⁹⁵, marcados com CFSE e analisados por citometria de fluxo. Nossos resultados representativos mostram uma leve proliferação de células T CD8+ (30% ou 19%) e CD4+ (22% ou 17%) em DCs tratadas com sHz acoplado e revestido com OVA, respectivamente (Fig. 10). Essa observação sugere que os cristais de hemozoina sintética podem induzir a apresentação cruzada de antígenos em células dendríticas.

Feito isso, testamos as sHz produzidas no contexto vacinal como ilustrado na Figura 11.

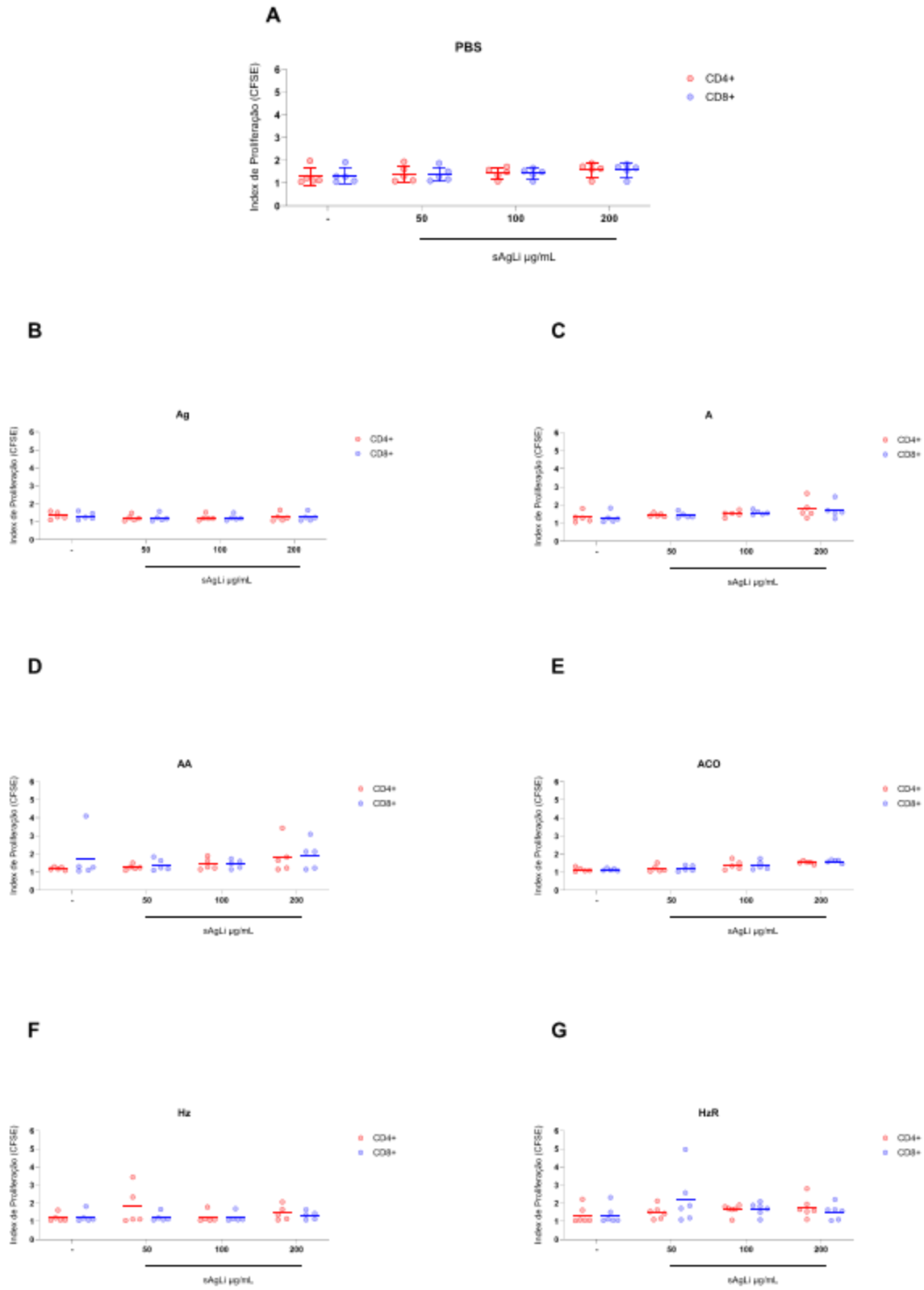
Figura 11 - Esquema de vacinação de camundongos BALB/c para profilaxia de leishmaniose visceral experimental



Os experimentos foram conduzidos em camundongos BALB/c fêmeas. Os grupos de imunização receberam doses subcutâneas nos dias 0, 14 e 28. Sete grupos foram formados, incluindo PBS, sHz, sAgLi, sAgLiHzAco, sAgLiHzRev, Alum e sAgLiAlum. Infectados intraperitonealmente com promastigotas de *Leishmania infantum*. Após 21 dias, os animais foram eutanasiados, e baços e fígados foram coletados para cultura celular e análise da carga parasitária.

Os resultados da Figura 12 indicam que a imunização dos camundongos não resultou em uma proliferação celular significativa nas populações de linfócitos T CD8+ e CD4+, contrariando as expectativas. Os camundongos foram divididos em sete grupos e imunizados por via subcutânea de acordo com seus grupos específicos. Após a imunização, os animais foram infectados com *L. infantum*, e 21 dias após a infecção, os baços foram coletados para o ensaio de proliferação celular.

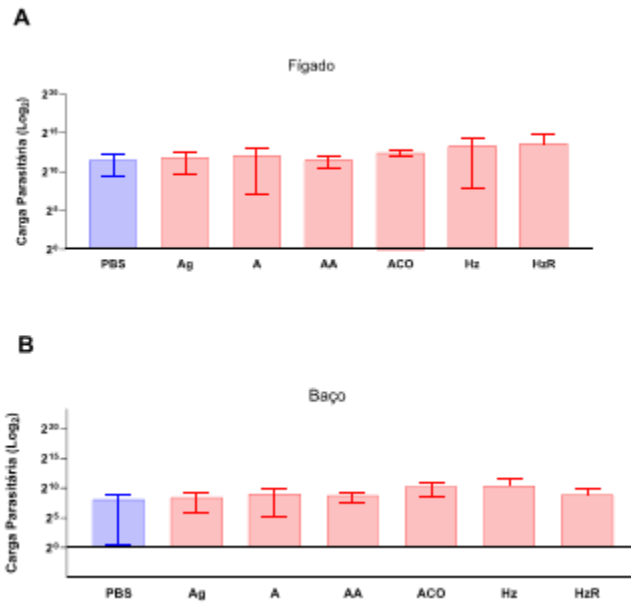
Figura 12 - Proliferação ex vivo de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados



Camundongos BALB/c foram divididos em sete grupos, PBS (Fig. A), sAgLi/Ag (Fig. B), Alum/A (Fig. C), Alum sAgLi/AA (Fig. D), HzAco/ACO (Fig. E), Hz (Fig. F) e HzRev/HzR (Fig. G) com 5-6 animais por grupo. Os camundongos foram imunizados por via subcutânea, de acordo com seu grupo, com PBS (100 µL/camundongo), sAgLi (100 µg/100 µL de PBS/camundongo), Alum (100 µL/camundongo), Alum sAgLi (100 µg de sAgLi/100 µL de Alum/camundongo), HzAco (800 µg/100 µL de PBS/camundongo), Hz (800 µg/100 µL de PBS/camundongo) e HzRev (100 µg de sAgLi/800 µg de Hz/100µL de PBS/camundongo) e receberam dois *boosts* com 14 dias de intervalo entre imunizações. Feita a imunização os animais foram infectados por via intraperitoneal com 10⁷ L. infantum e após 21 dias de infecção foi feita eutanásia e baços foram coletados para ensaio de proliferação celular. Os baços foram macerados e lisados e as células esplênicas (5x10⁵ /células/500 µL) foram lavadas com PBS/FBS 1% e marcadas ou não com corante fluorescente CFSE (10µM por 15 min). Feito isso, as células foram estimuladas com Hz (200 µg/mL), HzRev (20 µg de sAgLi/200 µg de Hz), HzAco (200 µg/mL) e sAgLi (50, 100 e 200 µg/mL) por 72 h. Os esplenócitos foram marcados com anti-CD3 (eBioscience), anti-CD8 (Biolegend) ou anti-CD4 (Biolegend), seguido por análise em citometria de fluxo (BD Accuri C6) e nos softwares FlowJo (BD Biosciences) e GraphPad Prism 8 (*two-way* ANOVA P= 0.05). Os dados mostram o index de proliferação das células triplamente marcadas para CFSE/CD3+/CD4+ ou CD8+.

Os dados mostram que a imunização com os diferentes compostos, incluindo sAgLi, Alum, HzAco, Hz, entre outros, não gerou uma resposta robusta de proliferação celular nas populações de linfócitos T CD8+ e CD4+. Os índices de proliferação das células marcadas com CFSE e positivas para CD3+/CD4+ ou CD8+ não apresentaram aumento significativo em comparação com os grupos de controle.

Figura 13 - Carga parasitária nos órgãos de camundongos BALB/c imunizados



Camundongos BALB/c foram divididos em sete grupos, PBS, sAgLi (Ag), Alum (A), Alum sAgLi (AA), HzAco (ACO), Hz (Hz) e HzRev (HzR) com 5-6 animais por grupo. Os camundongos foram imunizados por via subcutânea, de acordo com seu grupo, com PBS (100 µL/camundongo), sAgLi (100 µg/100 µL de PBS/camundongo), Alum (100 µL/camundongo), Alum sAgLi (100 µg de sAgLi/100 µL de Alum/camundongo), HzAco (800 µg/100 µL de PBS/camundongo), Hz (800 µg/100 µL de PBS/camundongo) e HzRev (100 µg de sAgLi/800 µg de Hz/100µL de PBS/camundongo) e receberam dois *boost* com 14 dias de intervalo entre imunizações. Feita a imunização os animais foram infectados por via intraperitoneal com 10 *L. infantum* e após 21 dias de infecção foi feita eutanásia e baços e fígados foram coletados para verificação da carga parasitária por diluição limitante. Fígado (A) e baço (B) foram macerados em 1 e 6 mL de PBS, respectivamente, e foi feita a diluição seriada (fator 2) dos mesmos em meio 199 completo, após 20 dias de incubação a 28 °C foi feita a leitura por microscopia ótica comum da diluição limitante (*two-way* ANOVA P= 0.05). O fator de diluição foi determinado como o último poço onde foi observado a presença de promastigotas.

A análise dos resultados, conforme representado na Figura 13, revela que a imunização dos camundongos também não resultou na esperada diminuição da carga parasitária no baço e fígado. Após a eutanásia, baços e fígados foram coletados para avaliação da carga parasitária através de diluição limitante. Não foi observada uma redução significativa na carga parasitária nos grupos imunizados em comparação com os grupos de controle. Nesses experimentos, os diferentes regimes de imunização,

incluindo aqueles com hemozoina sintética e suas variantes, não parecem ter contribuído para uma resposta eficaz contra a infecção por *L. infantum*.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, confirmamos que a sHz transporta efetivamente antígenos revestidos e acoplados sem impedir a internalização. Além disso, nossas observações revelaram que esse composto induz uma diminuição na acidez do fagossomo, criando um ambiente mais favorável para a apresentação de antígenos. Essa alteração tem o potencial de aprimorar a apresentação cruzada de antígenos de *Leishmania infantum*.

No presente projeto foram produzidos o anidrido de hematina ou hemozoina sintética acoplado/revestida ou não com OVA e o antígeno solúvel de *L. infantum*. Nossas análises via SDS-PAGE em gel de poliacrilamida, demonstraram que os cristais de hemozoina, foram capazes de carregar a OVA tanto revestida quanto acoplada (Fig. 4). Estudos anteriores sugerem que a hemozoina sintética pode ser utilizada como adjuvante em vacinas, pois é capaz de entregar os antígenos de interesse para às DCs, possivelmente por estas possuírem o receptor CLEC12A, capaz de reconhecer os cristais de hemozoina⁴²⁻⁴⁴. Embora o uso da Hz como adjuvante em vacinas seja uma questão já estudada, a apresentação cruzada de antígenos, induzida também pela hemozoina, ainda não foi explorada nesse contexto de vacinação, sendo esse um dos principais objetivos dessa pesquisa.

Como já relatado em literatura, as DCs, entre as demais células apresentadoras de antígenos, são as que possuem maior potencial de desencadear uma resposta imune adaptativa em infecções, além de proporcionarem um ambiente menos hostil aos antígenos, se comparadas aos macrófagos, favorecendo a apresentação cruzada de antígenos⁵⁶⁻⁵⁸. Também é sabido, que as DCs atuam como moduladoras da resposta imune adaptativa na leishmaniose e que através das citocinas secretadas e dos processos de sinalização subjacentes, elas polarizam os subtipos e células T *helper*⁷⁰. Portanto, o anidrido de hematina pode ser utilizado com adjuvante em vacinas, por carrear antígenos, facilitando sua entrega para células fagocíticas, e estimular a apresentação cruzada de antígenos, aumentando as chances de resolução da doença, através da ação conjunta de TCD8 e TCD4^{+73,96}, principalmente no combate a forma mais severa da leishmaniose.

Numerosas pesquisas destacam o papel crucial da apresentação cruzada na potencialização das respostas imunológicas^{50,97-100}. Como exemplo, a interferência nesse mecanismo pode ser crucial para a proteção do hospedeiro durante a infecção

por *Leishmania*^{101–104}. Neste estudo, buscamos investigar a hemozoina sintética, um potencial nanocarreador, que poderia aprimorar a apresentação cruzada em células dendríticas. Estudos anteriores⁴⁶ utilizaram a estratégia de hemozoina sintética como adjuvante em vacinas, assim como na melhoria do tamanho dos cristais obtidos na técnica de síntese, conforme realizado nesta pesquisa (Figura 3, 4 e 5). Além disso, patentes internacionais, incluindo WO2007147255 e EP2514438, já exploraram o potencial da hemozoina sintética como adjuvante em vacinas. Além disso, a aplicação da patente US8974795 propôs o acoplamento de antígenos na etapa de acidificação da hemozoina durante seu processo de síntese, possibilitando a ocupação dos espaços presentes entre os dímeros de hemina, promovendo a liberação lenta de antígeno^{83,105,106}. No entanto, nenhuma dessas patentes explorou ainda o contexto de apresentação cruzada induzida pela hemozoina ou o impacto desses cristais na internalização e pH fagossomal, conforme proposto neste estudo.

O cristal nativo é prontamente internalizado assim que entra na corrente sanguínea, e, conforme observado em nosso estudo (Figura 6), a versão sintética também passa por essa internalização rápida, tornando-se perceptível nos primeiros 30 minutos a 2 horas após a exposição (*live cell image* - dados não mostrados). Essa internalização detectável persiste, e o cristal nativo pode permanecer estável por uma duração prolongada de até 120 horas, como demonstrado por outro grupo¹⁰⁷. Nesse sentido, a sHz carregando antígenos (acoplados ou revestidos) também não interrompeu o mecanismo de internalização. No entanto, vale ressaltar que, enquanto os compostos de sHz permanecem associados ao fagossoma, antígenos acoplados ou revestidos podem passar por vias de processamento distintas.

Outro fator importante sobre a sHz percebido em nosso estudo é sua capacidade, uma vez internalizado, de modular o pH fagossomal sem induzir de forma significativa a ativação da catepsina B, como observado nas Figuras 7 e 8. Um resultado semelhante, quanto à não ativação da catepsina B, já foi observado anteriormente em células dendríticas derivadas da medula óssea³⁸ para a hemozoina nativa em um contexto de inflamassoma Nalp3. Outro estudo mostrou o evento oposto, observando a ativação da catepsina B em macrófagos derivados da medula óssea estimulados com sHZ¹⁰⁸, essas diferenças podem ser devidas ao tipo de Hz e ao tipo de célula. portanto, são necessárias investigações adicionais para concluir sua correlação com a sHz. Neste estudo, também utilizamos antígenos de *Leishmania*

infantum para testar a capacidade do nanocarreador de realizar a apresentação cruzada desse antígeno de parasita clinicamente relevante. *Leishmania* spp. pode interferir na expressão de MHC classe I e II em DCs e macrófagos^{109–113}. É evidente neste estudo que este cristal não só pode transportar o sAgLi (Figuras 4, 5 e 6), mas também ajudar a preservá-lo uma vez internalizado, devido à sua capacidade de manter o pH fagossomal menos ácido (Figura 8).

Um fator-chave para a apresentação cruzada é a preservação do antígeno¹¹⁴, e demonstramos em nosso estudo que a sHz é capaz disso devido à modulação do pH fagossomal. Utilizando um epítipo específico da ovalbumina, SIINFEKL, e um modelo de co-cultura com células T CD8+ e CD4+, acessamos a capacidade intrínseca de apresentação cruzada do cristal sintético em células dendríticas (Figura 9 e 10). Além disso, Raulf *et al.*⁴³ também mostraram que cristais nativos de hemozoina induziram a apresentação de antígenos fagocitados via MHC classe I, por meio da apresentação cruzada em células dendríticas, e observamos que o nanocarreador sintético poderia manter essa capacidade. A regulação negativa da expressão de MHC faz parte do arsenal de mecanismos de evasão do sistema imunológico usados pelo *Leishmania*¹¹⁵, e, como discutido em vários estudos, a interferência na apresentação cruzada é crucial para a proteção das respostas antileishmania^{99,102–104}. Um estudo recente realizado por Khouili *et al.*⁹⁹ sobre o impacto da fosfatase SHP-1 na apresentação cruzada de antígenos do *Leishmania* mostrou que a inibição da SHP-1 melhorou a imunização em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, promovendo respostas protetoras por meio da apresentação cruzada. As células T CD8+ têm duas funções principais relacionadas: a citolítica e a produção de citocinas/quimiocinas¹¹⁶. O envolvimento dessas células em infecções por *Leishmania* foi relatado com diferentes espécies, incluindo *L. major*^{117,118}, *L. donovani*^{119,120}, e *L. amazonensis*¹²¹, sugerindo que a ativação das células T CD8+ pode conferir efeitos positivos. Rodrigues *et al.*¹²² também mostraram a prevalência de um perfil CD8High em pacientes curados de leishmaniose visceral. Mais recentemente, Ashok *et al.*¹²³, usando camundongos Batf3-/- que carecem de células dendríticas CD8α+ e CD103+, demonstraram que esses camundongos mostraram maior susceptibilidade à infecção por *L. major*, relacionada à baixa capacidade de apresentação cruzada e alta produção de IL-12¹²³. O impacto da participação das células T CD8+ em infecções por *Leishmania* pode depender da espécie, enquanto *L.*

braziliensis induz um perfil inflamatório com maior produção de granzima A e razão IFN/IL-10, *L. infantum* tem uma razão IFN/IL-10 mais baixa e maior expressão de CTLA-4¹²⁴⁻¹²⁶. A inibição da apresentação cruzada é descrita como um importante mecanismo de evasão do sistema imunológico usado por esses parasitas. A apresentação de antígenos e a ativação de células T CD8+ foram mostradas como alvos do *Leishmania* por meio de vários mecanismos, como dificultar a expressão antigênica na superfície celular, induzindo uma fluidez de membrana defeituosa¹²⁷.

É importante destacar que a falta de proliferação celular observada na Figura 12 ou a incapacidade de diminuir a carga parasitaria (Fig. 13) pode sugerir uma limitação na resposta imunológica gerada pela imunização, indicando a necessidade de avaliar e otimizar as estratégias de imunização utilizadas nos experimentos, como talvez mudar a via de vacinação ou até mesmo o modelo animal. Trabalhos anteriores com modelo de vacinação subcutânea para sHz mostram resultados contrastantes com o encontrado no nosso trabalho (Figura 12 e 13). Hussein *et al.*¹²⁸ Mostrou que a imunização para *Klebsiella pneumoniae* em camundongos Swiss não foi suficiente para proteger os animais a dose letal do patógeno após imunização com sHz. Tougan e sua equipe¹²⁹ em contrapartida evidenciaram que a sHz teve a capacidade de provocar uma resposta imunológica do tipo Th2 em um modelo de infecção por malária em um modelo animal com primatas não humanos já em outro modelo para alergia canina¹³⁰ o sHz estimulou uma resposta imune do tipo Th1. Em outro estudo utilizando furões a sHz foi capaz de estimular uma resposta protetora ao vírus da influenza sem causar uma reação pirogênica¹³¹. Além disso, a análise detalhada das condições experimentais, dos compostos utilizados e da resposta celular específica pode fornecer *insights* valiosos para entender e aprimorar a eficácia da imunização contra a infecção por *L. infantum*.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, até o presente momento, foi possível verificar que o anidrido de hematina carrega o antígeno OVA, tanto acoplado nas suas lacunas durante a síntese ou revestido no cristal já formado, para antígenos de *L. infantum*, foi possível verificar apenas o revestimento bem-sucedido dos cristais e estes compostos foram capazes de induzir a proliferação dos linfócitos T CD8⁺ via apresentação cruzada de antígenos.

Essas descobertas contribuem para o crescente corpo de literatura que explora as potenciais aplicações da hemozoina sintética como carregador de antígenos. A capacidade observada da hemozoina sintética de manter uma internalização eficaz, influenciar o pH lisossomal e facilitar a apresentação cruzada destaca seu potencial, potencial no desenvolvimento de vacinas e imunoterapias mesmo que não tenhamos observado isso em nossos experimentos na vertente vacinal. Investigações adicionais são necessárias para desvendar os mecanismos moleculares subjacentes e otimizar a implementação estratégica da hemozoina sintética na entrega de antígenos e na modulação imunológica, alinhando-se ao cenário em constante evolução da pesquisa biomédica.

Em conclusão, nosso estudo lança luz sobre as interações multifacetadas entre a hemozoina sintética, antígenos e células dendríticas. A sutil modulação do pH lisossomal e o potencial de apresentação cruzada observado abrem novos caminhos para a pesquisa no campo da imunoterapia. É essencial considerar possíveis razões para essa ausência de eficácia vacinal, como a escolha do protocolo de imunização, ou possíveis interações entre os componentes utilizados. Esta discrepância entre as expectativas e os resultados destaca a complexidade da resposta imunológica e a necessidade de uma análise mais aprofundada para compreender as nuances do sistema imunológico nesse contexto específico. Futuros esforços devem visar decifrar os mecanismos moleculares subjacentes a essas interações e explorar as aplicações práticas da hemozoina sintética na melhoria da entrega de antígenos e outras substâncias.

REFERÊNCIAS

1. WHO, World Health Organization. Leishmaniasis Key Facts [Internet]. WHO. 2022 [cited 2022 Sep 14]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses, Informe epidemiológico das Américas [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 14]. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>
3. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis. Vol. 26, Infectious Disease Clinics of North America. 2012. p. 309–22.
4. Mann S, Frasca K, Scherrer S, Henao-Martínez AF, Newman S, Ramanan P, et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>
5. Aronson NE, Joya CA. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. Vol. 33, Infectious Disease Clinics of North America. W.B. Saunders; 2019. p. 101–17.
6. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. Vol. 10, Future Microbiology. Future Medicine Ltd.; 2015. p. 111–29.
7. Arango Duque G, Descoteaux A. Leishmania survival in the macrophage: Where the ends justify the means. Vol. 26, Current Opinion in Microbiology. Elsevier Ltd; 2015. p. 32–40.
8. PAHO, Pan American Health Organization. Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas. Washington, D.C; 2019.
9. Arenas R, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: A review. F1000Res. 2017;6(May):1–15.
10. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde D de VE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana [Internet]. 2. ed. atu. Brasília, Editora do Ministério da Saúde; 2013. 180 p. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana_2edicao.pdf
11. Bates PA, Depaquit J, Galati EAB, Kamhawi S, Maroli M, McDowell MA, et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. Parasit Vectors [Internet]. 2015;8(1):131. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0712-x>
12. CDC C for DC and P. Leishmaniasis [Internet]. DPDx, Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. 2017 [cited 2020 Sep 26]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
13. OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde O. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas 2018 [Internet]. Nº 7. p. 8. Available from: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?ua=1>
14. Leishmaniose visceral: epidemiologia, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção.
15. Brasil, Ministério da Agricultura P e A, Saúde M da. Nota Técnica Nº 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa [Internet]. Autorização para uso de milteforan no

- tratamento de leishmaniose visceral canina 2016 p. 1. Available from:
<http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>
16. Shio MT, Paquet M, Martel C, Bosschaerts T, Stienstra S, Olivier M, et al. Drug Delivery by Tattooing to Treat Cutaneous Leishmaniasis. *Sci Rep* [Internet]. 2014;4(1):4156. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep04156>
 17. Treiger Borborema SE, Schwendener RA, Osso Junior JA, de Andrade Junior HF, do Nascimento N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania* (*Leishmania*) major-infected macrophages. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Oct;38(4):341–7.
 18. Roychoudhury J, Sinha R, Ali N. Therapy with sodium stibogluconate in stearylamine-bearing liposomes confers cure against SSG-resistant *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *PLoS One*. 2011;6(3).
 19. Brown M, Noursadeghi M, Boyle J, Davidson RN. Successful liposomal amphotericin B treatment of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *British Journal of Dermatology*. 2005 Jul;153(1):203–5.
 20. Ho NI, Huis In 't Veld LGM, Raaijmakers TK, Adema GJ. Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines? *Front Immunol*. 2018;9(December):2874.
 21. Rajput ZI, Hu S hua, Xiao C wen, Arijo AG. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007;8(3):153–61.
 22. Askarizadeh A, Badiie A, Khamesipour A. Development of nano-carriers for *Leishmania* vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2020;17(2):167–87. Available from: <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1713746>
 23. Gradoni L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Vet Parasitol* [Internet]. 2015;208(1–2):94–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.003>
 24. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Hum Immunol* [Internet]. 2009;70(6):383–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.007>
 25. Iborra S, Soto M, Carrión J, Alonso C, Requena JM. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 2004;22(29–30):3865–76.
 26. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Vet Parasitol*. 2007;149(3–4):139–46.
 27. Ikeogu NM, Akaluka GN, Edechi CA, Salako ES, Onyilagha C, Barazandeh AF, et al. *Leishmania* immunity: Advancing immunotherapy and vaccine development. *Microorganisms*. 2020;8(8):1–21.
 28. Brasil Ministério da Agricultura e Pecuária. Mapa Suspende Fabricação e Venda e Determina o Recolhimento de lotes de Vacina Contra Leishmaniose. 2023.

29. Osman M, Mistry A, Keding A, Gabe R, Cook E, Forrester S, et al. A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(5):1–24.
30. Younis BM, Osman M, Khalil EAG, Santoro F, Furini S, Wiggins R, et al. Safety and immunogenicity of ChAd63-KH vaccine in post-kala-azar dermal leishmaniasis patients in Sudan. *Molecular Therapy*. 2021 Jul 7;29(7):2366–77.
31. Coronado LM, Nadovich CT, Spadafora C. Malarial hemozoin: From target to tool. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* [Internet]. 2014;1840(6):2032–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.009>
32. Bellemare MJ. The Malaria Pigment Hematin Anhydride : Surface Chemistry and Photoluminescence Phenomenon. 2009.
33. Jaramillo M, Plante I, Ouellet N, Vandal K, Tessier PA, Olivier M. Hemozoin-Inducible Proinflammatory Events In Vivo: Potential Role in Malaria Infection. *The Journal of Immunology*. 2004;172(5):3101–10.
34. Jaramillo M, Bellemare MJ, Martel C, Shio MT, Contreras AP, Godbout M, et al. Synthetic Plasmodium-like hemozoin activates the immune response: A morphology - Function study. *PLoS One*. 2009;4(9).
35. Shio MT, Kassa FA, Bellemare MJ, Olivier M. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes Infect*. 2010;12(12–13):889–99.
36. Keller CC, Davenport GC, Dickman KR, Hittner JB, Kaplan SS, Weinberg JB, et al. Suppression of prostaglandin E2 by malaria parasite products and antipyretics promotes overproduction of tumor necrosis factor- α : Association with the pathogenesis of childhood malarial anemia. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;193(10):1384–93.
37. Prato M, Giribaldi G, Polimeni M, Gallo V, Arese P. Phagocytosis of Hemozoin Enhances Matrix Metalloproteinase-9 Activity and TNF- α Production in Human Monocytes: Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Falciparum Malaria. *The Journal of Immunology*. 2005;175(10):6436–42.
38. Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One*. 2009;4(8):1–10.
39. Tiemi Shio M, Eisenbarth SC, Savaria M, Vinet AF, Bellemare MJ, Harder KW, et al. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog*. 2009;5(8).
40. Lahoud MH, Proietto AI, Ahmet F, Kitsoulis S, Eidsmo L, Wu L, et al. The C-Type Lectin Clec12A Present on Mouse and Human Dendritic Cells Can Serve as a Target for Antigen Delivery and Enhancement of Antibody Responses. *The Journal of Immunology*. 2009;182(12):7587–94.
41. Pyz E, Huysamen C, Marshall ASJ, Gordon S, Taylor PR, Brown GD. Characterisation of murine MICL (CLEC12A) and evidence for an endogenous ligand. *Eur J Immunol*. 2008;38(4):1157–63.
42. Neumann K, Castiñeiras-Vilariño M, Höckendorf U, Hanneschläger N, Lemeer S, Kupka D, et al. Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. *Immunity*. 2014;40(3):389–99.

43. Raulf MK, Johannssen T, Matthiesen S, Neumann K, Hachenberg S, Mayer-Lambertz S, et al. The C-type Lectin Receptor CLEC12A Recognizes Plasmodial Hemozoin and Contributes to Cerebral Malaria Development. *Cell Rep*. 2019;28(1):30-38.e5.
44. Wakim LM, Smith J, Caminschi I, Lahoud MH, Villadangos JA. Antibody-targeted vaccination to lung dendritic cells generates tissue-resident memory CD8 T cells that are highly protective against influenza virus infection. *Mucosal Immunol*. 2015;8(5):1060–71.
45. Hutten TJA, Thordardottir S, Fredrix H, Janssen L, Woestenenk R, Tel J, et al. CLEC12A-Mediated Antigen Uptake and Cross-Presentation by Human Dendritic Cell Subsets Efficiently Boost Tumor-Reactive T Cell Responses. *The Journal of Immunology*. 2016;197(7):2715–25.
46. Lee MSJ, Igari Y, Tsukui T, Ishii KJ, Coban C. Current status of synthetic hemozoin adjuvant: A preliminary safety evaluation. *Vaccine*. 2016 Apr;34(18):2055–61.
47. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor h antigens with h-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*. 1976;143:6.
48. Gutiérrez-Martínez E, Planès R, Anselmi G, Reynolds M, Menezes S, Adiko AC, et al. Cross-presentation of cell-associated antigens by MHC class I in dendritic cell subsets. *Front Immunol*. 2015;6(JUL).
49. Li B, Hu L. Cross-presentation of Exogenous Antigens. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2019;26(4):346–51.
50. Colbert JD, Cruz FM, Rock KL. Cross-presentation of exogenous antigens on MHC I molecules. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2020;64:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.12.005>
51. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity*. 2004;21(2):155–65.
52. Dingjan I, Paardekooper LM, Verboogen DRJ, von Mollard GF, ter Beest M, van den Bogaart G. VAMP8-mediated NOX2 recruitment to endosomes is necessary for antigen release. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 2017;96(7):705–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.06.007>
53. Kovacsóvics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science (1979)*. 1995;267(5195):243–6.
54. Arasaki K, Roy CR. Legionella pneumophila Promotes Functional Interactions between Plasma Membrane Syntaxins and Sec22b. 2010;(1):587–600.
55. Sugita M, Brenner MB. Association of the invariant chain with major histocompatibility complex class I molecules directs trafficking to endocytic compartments. Vol. 270, *Journal of Biological Chemistry*. 1995. p. 1443–8.
56. Steinman RM. Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells. *Innate Immunity to Pulmonary Infection*. 2008;101–13.
57. Reis E Sousa C. Activation of dendritic cells: Translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(1):21–5.
58. Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science (1979)*. 2005;307(5715):1630–4.

59. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 Controls Phagosomal pH to Regulate Antigen Processing during Crosspresentation by Dendritic Cells. *Cell*. 2006;126(1):205–18.
60. Bajtay Z, Csomor E, Sándor N, Erdei A. Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol Lett*. 2006;104(1–2):46–52.
61. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):77–84.
62. Imai T, Kato Y, Kajiwara C, Mizukami S, Ishige I, Ichiyanagi T, et al. Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(39):16363–8.
63. Wang D, Sun B, Feng M, Feng H, Gong W, Liu Q, et al. Role of scavenger receptors in dendritic cell function. *Hum Immunol [Internet]*. 2015;76(6):442–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2015.03.012>
64. Nierkens S, Tel J, Janssen E, Adema GJ. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: One general or all sergeants? *Trends Immunol [Internet]*. 2013;34(8):361–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.02.007>
65. Miloud T, Hämmerling GJ, Garbi N. Review of murine dendritic cells: types, location, and development. *Methods Mol Biol*. 2010;595(4):21–42.
66. Tel J, Sittig SP, Blom RAM, Cruz LJ, Schreibelt G, Figdor CG, et al. Targeting Uptake Receptors on Human Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Antigen Cross-Presentation and Robust Type I IFN Secretion. *The Journal of Immunology*. 2013;191(10):5005–12.
67. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol [Internet]*. 2012;12(8):557–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3254>
68. Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(6):1273–81.
69. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2(June):83.
70. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):984–93.
71. Soong L. Modulation of Dendritic Cell Function by *Leishmania* Parasites . *The Journal of Immunology*. 2008;180(7):4355–60.
72. Arango Duque G, Jardim A, Gagnon É, Fukuda M, Descoteaux A. The host cell secretory pathway mediates the export of *Leishmania* virulence factors out of the parasitophorous vacuole. *PLoS Pathog*. 2019;15(7):1–25.
73. Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, et al. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe*. 2013;14(1):15–25.
74. Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, et al. Host cell signalling and *leishmania* mechanisms of evasion. *J Trop Med*. 2012;2012:819512.

75. Brewig N, Kissenpfennig A, Malissen B, Veit A, Bickert T, Fleischer B, et al. Priming of CD8 + and CD4 + T Cells in Experimental Leishmaniasis Is Initiated by Different Dendritic Cell Subtypes . *The Journal of Immunology*. 2009;182(2):774–83.
76. Belkaid Y, von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, et al. CD8 + T Cells Are Required for Primary Immunity in C57BL/6 Mice Following Low-Dose, Intradermal Challenge with *Leishmania major* . *The Journal of Immunology*. 2002;168(8):3992–4000.
77. Brosch S, Tenzer S, Akkad N, Lorenz B, Schild H, Stebut E von. Priming of leishmania-reactive CD8 T cells in vivo does not require LMP7-containing immunoproteasomes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(4):1302–5.
78. Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: The latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11).
79. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. Vol. 16, *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd.; 2018.
80. Schroeder J, Aebischer T. Vaccines for leishmaniasis: From proteome to vaccine candidates. *Hum Vaccin*. 2011;7(SUPPL.):10–5.
81. Leite JC, Gonçalves AAM, de Oliveira DS, Resende LA, Boas DFV, Ribeiro HS, et al. Transmission-Blocking Vaccines for Canine Visceral Leishmaniasis: New Progress and Yet New Challenges. Vol. 11, *Vaccines*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
82. Regina-Silva S, Feres AMLT, França-Silva JC, Dias ES, Michalsky ÉM, de Andrade HM, 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*. 2016;34(19):2233–9.
83. Olivier M, Bellemare MJ. Controlled release formulation based on hematin anhydride crystals for the induction of an innate immune reaction. US8974795, 2011.
84. Adler J, Parmryd I. Quantifying colocalization by correlation: The pearson correlation coefficient is superior to the Mander’s overlap coefficient. *Cytometry Part A*. 2010 Aug;77(8):733–42.
85. Savina A, Peres A, Cebrian I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, et al. The Small GTPase Rac2 Controls Phagosomal Alkalinization and Antigen Crosspresentation Selectively in CD8+ Dendritic Cells. *Immunity* [Internet]. 2009;30(4):544–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.013>
86. Tang M, Chen B, Xia H, Pan M, Zhao R, Zhou J, et al. pH-gated nanoparticles selectively regulate lysosomal function of tumour-associated macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Commun* [Internet]. 2023;14(1):5888. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41592-0>
87. Alloatti A, Kotsias F, Pauwels AM, Carpier JM, Jouve M, Timmerman E, et al. Toll-like Receptor 4 Engagement on Dendritic Cells Restrains Phago-Lysosome Fusion and Promotes Cross-Presentation of Antigens. *Immunity*. 2015;43(6):1087–100.
88. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 Controls Phagosomal pH to Regulate Antigen Processing during Crosspresentation by Dendritic Cells.

- Cell [Internet]. 2006;126(1):205–18. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867406007616>
89. Van Noorden CJF, Boonacker E, Bissell ER, Meijer AJ, van Marle J, Smith RE. Ala-Pro-Cresyl Violet, a Synthetic Fluorogenic Substrate for the Analysis of Kinetic Parameters of Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) in Individual Living Rat Hepatocytes. *Anal Biochem* [Internet]. 1997;252(1):71–7. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269797923125>
 90. Samanta D, Clemente TM, Schuler BE, Gilk SD. *Coxiella burnetii* Type 4B Secretion System-dependent manipulation of endolysosomal maturation is required for bacterial growth. *PLoS Pathog* [Internet]. 2019 Dec 23;15(12):e1007855-. Available from:
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007855>
 91. Ishida Y, Nayak S, Mindell JA, Grabe M. A model of lysosomal pH regulation. *Journal of General Physiology*. 2013 Jun;141(6):705–20.
 92. Mindell JA. Lysosomal Acidification Mechanisms. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2012 Feb 15;74(1):69–86. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142317>
 93. Lindner B, Burkard T, Schuler M. Phagocytosis assays with different pH-sensitive fluorescent particles and various readouts. *Biotechniques*. 2020 Feb 21;68.
 94. Eisen HN, Hou XH, Shen C, Wang K, Tanguturi VK, Smith C, et al. Promiscuous binding of extracellular peptides to cell surface class I MHC protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 20;109(12):4580–5.
 95. Yu Y, Liu S, Wang W, Song W, Zhang M, Zhang W, et al. Involvement of tumour necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand in enhanced cytotoxicity of lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells to activated T cells. *Immunology*. 2002 Aug 1;106:308–15.
 96. Tibúrcio R, Nunes S, Nunes I, Ampuero MR, Silva IB, Lima R, et al. Molecular aspects of dendritic cell activation in leishmaniasis: An immunobiological view. *Front Immunol*. 2019;10(FEB).
 97. Zhang T, Aipire A, Li Y, Guo C, Li J. Antigen cross-presentation in dendric cells: From bench to bedside. Vol. 168, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2023.
 98. Kim CG, Lee JC, Ju D Bin, Kim SK, Yun CH, Cho CS. Enhancement of Immune Responses Elicited by Nanovaccines through a Cross-Presentation Pathway. Vol. 20, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society; 2023. p. 355–70.
 99. C. Khouili S, Cook ECL, Hernández-García E, Martínez-López M, Conde-Garrosa R, Iborra S. SHP-1 Regulates Antigen Cross-Presentation and Is Exploited by *Leishmania* to Evade Immunity. *Cell Rep*. 2020 Dec 1;33(9).
 100. Kim CG, Kye YC, Yun CH. The role of nanovaccine in cross-presentation of antigen-presenting cells for the activation of CD8+ T cell responses. Vol. 11, *Pharmaceutics*. MDPI AG; 2019.
 101. C. Khouili S, Cook ECL, Hernández-García E, Martínez-López M, Conde-Garrosa R, Iborra S. SHP-1 Regulates Antigen Cross-Presentation and Is Exploited by *Leishmania* to Evade Immunity. *Cell Rep*. 2020;33(9).

102. Dingjan I, Paardekooper LM, Verboogen DRJ, von Mollard GF, ter Beest M, van den Bogaart G. VAMP8-mediated NOX2 recruitment to endosomes is necessary for antigen release. *Eur J Cell Biol.* 2017 Oct 1;96(7):705–14.
103. Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, et al. Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe.* 2013 Jul 17;14(1):15–25.
104. Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C, et al. Leishmania Antigens Are Presented to CD8 + T Cells by a Transporter Associated with Antigen Processing-Independent Pathway In Vitro and In Vivo . *The Journal of Immunology.* 2006 Sep 15;177(6):3525–33.
105. Akira KI, Coban C, Tsukui T, Igari Y, Ohata K. Adjuvant containing β -hematin. EP2514438, 2010.
106. Olivier M, Bohle DS. Synthetic monodisperse hemozoin crystals preparation and uses thereof. WO2007147255, 2010.
107. Eugenin EA, Martiney JA, Berman JW. The malaria toxin hemozoin induces apoptosis in human neurons and astrocytes: Potential role in the pathogenesis of cerebral malaria. *Brain Res.* 2019 Oct 1;1720.
108. Tiemi Shio M, Eisenbarth SC, Savaria M, Vinet AF, Bellemare MJ, Harder KW, et al. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog.* 2009 Aug;5(8).
109. Rezvan H, Ali SA, Navard SH. Inhibitory Effects of Leishmania Mexicana infection on MHC-I Expression in Bone Marrow Derived Dendritic Cells [Internet]. Vol. 17. Available from: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>
110. Nadaes NR, Silva da Costa L, Santana RC, LaRocque-de-Freitas IF, Vivarini Á de C, Soares DC, et al. DH82 Canine and RAW264.7 Murine Macrophage Cell Lines Display Distinct Activation Profiles Upon Interaction With Leishmania infantum and Leishmania amazonensis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Jun 12;10.
111. Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, Antoine JC. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of Leishmania amazonensis: The role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci.* 2004 Jan 15;117(2):315–25.
112. Bennett CL, Colledge L, Richards HE, Reay PA, Blackburn CC, Aebischer T. Uncompromised generation of a specific H-2DM-dependent peptide-MHC class II complex from exogenous antigen in Leishmania mexicana-infected dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003 Dec;33(12):3504–13.
113. Muraille E, De Trez C, Pajak B, Torrentera FA, De Baetselier P, Leo O, et al. Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with Leishmania major. *Infect Immun.* 2003 May 1;71(5):2704–15.
114. Blander JM. Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2018;36(1):717–53. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055523>
115. Zand M, Narasu M. Leishmania Mechanisms of Evasion. 2019 Jan 30;

116. Varadarajan N, Julg B, Yamanaka YJ, Chen H, Ogunniyi AO, McAndrew E, et al. A high-throughput single-cell analysis of human CD8 + T cell functions reveals discordance for cytokine secretion and cytolysis. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Nov 1;121(11):4322–31.
117. Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, et al. CD8 + T Cells Are Required for Primary Immunity in C57BL/6 Mice Following Low-Dose, Intradermal Challenge with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*. 2002 Apr 15;168(8):3992–4000.
118. Muller I, Kropf P, Etges RJ, Louis' JA. Gamma Interferon Response in Secondary *Leishmania major* Infection: Role of CD8+ T Cells [Internet]. *INFECrION AND IMMUNITY*. 1993. Available from: <http://iai.asm.org/>
119. Kaushal H, Bras-Gonçalves R, Negi NS, Lemesre JL, Papierok G, Salotra P. Role of CD8+ T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1).
120. Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 2014 Jan 15;209(2):290–9.
121. Colmenares M, Kima PE, Samoff E, Soong L, McMahon-Pratt D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun*. 2003 Jun 1;71(6):3172–82.
122. Rodrigues LS, Barreto AS, Bomfim LGS, Gomes MC, Ferreira NLC, da Cruz GS, et al. Multifunctional, TNF- α and IFN- γ -Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8High T Cells Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol*. 2021 Oct 28;12.
123. Ashok D, Schuster S, Ronet C, Rosa M, Mack V, Lavanchy C, et al. Cross-presenting dendritic cells are required for control of *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*. 2014;44(5):1422–32.
124. Cardoso TM, Machado Á, Costa DL, Carvalho LP, Queiroz A, Machado P, et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun*. 2015;83(3):898–906.
125. Cunha CF, Ferraz-Nogueira R, Costa VFA, Pimentel MIF, Chometon TQ, Lyra MR, et al. Contribution of *Leishmania braziliensis* antigen-specific CD4+ T, CD8+ T, NK and CD3+CD56+NKT cells in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis patients: Cytotoxic, activation and exhaustion profiles. *PLoS One*. 2020;15(3).
126. Viana AG, Magalhães LMD, Giunchetti RC, Dutra WO, Gollob KJ. *Leishmania infantum* induces expression of the negative regulatory checkpoint, CTLA-4, by human naïve CD8+ T cells. *Parasite Immunol*. 2019;41(9):4–9.
127. Pradhan S, Ghosh S, Hussain S, Paul J, Mukherjee B. Linking membrane fluidity with defective antigen presentation in leishmaniasis. Vol. 43, *Parasite Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2021.
128. Hussein KE, Bahey-El-Din M, Sheweita SA. Immunization with the outer membrane proteins OmpK17 and OmpK36 elicits protection against *Klebsiella pneumoniae* in the murine infection model. *Microb Pathog* [Internet]. 2018;119:12–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017314900>

129. Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, et al. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(2):283–90.
130. Coban C, Yagi M, Ohata K, Igari Y, Tsukui T, Horii T, et al. The Malarial Metabolite Hemozoin and Its Potential Use as a Vaccine Adjuvant [Internet]. Vol. 59, *Allergology International*. 2010. Available from: www.jsaweb.jp/
131. Uraki R, Das SC, Hatta M, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Ozawa M, et al. Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine. *Vaccine.* 2014;32(41):5295–300.