

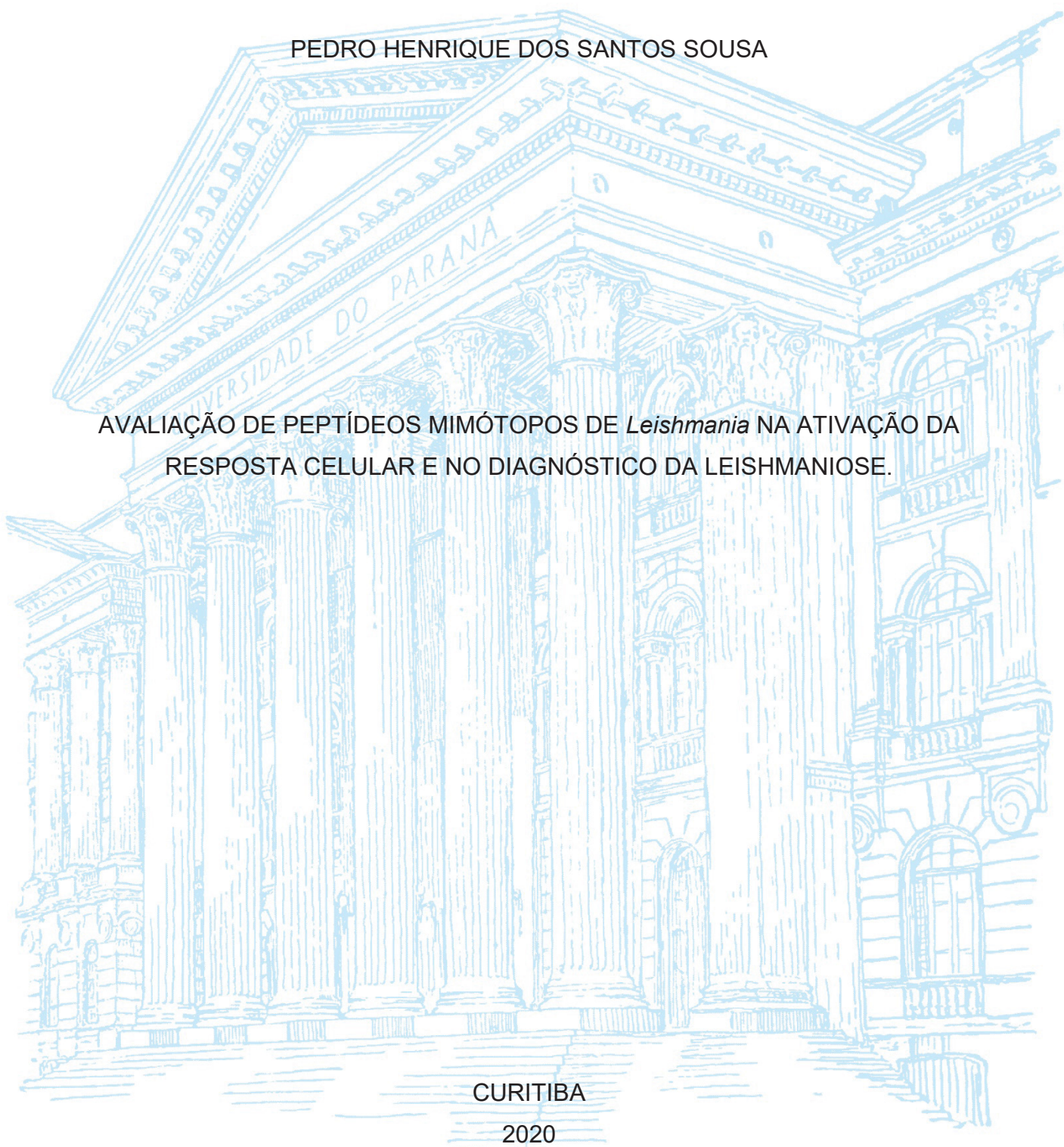
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS SOUSA

AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÓTIPOS DE *Leishmania* NA ATIVAÇÃO DA
RESPOSTA CELULAR E NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE.

CURITIBA

2020



PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS SOUSA

AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÓTOPOS DE *Leishmania* NA ATIVAÇÃO DA
RESPOSTA CELULAR E DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE.

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Profa Dra. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S725a Sousa, Pedro Henrique dos Santos
Avaliação de peptídeos mimótopos de *Leishmania* na ativação da
resposta celular e no diagnóstico da leishmaniose. [recurso eletrônico] /
Pedro Henrique dos Santos Sousa – Curitiba, 2020.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

1. Leishmaniose. 2. Immunodiagnosis. 3. Immunoprophylaxis. I.
Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Vanete Thomaz. III. Título.

CDD: 616.9364

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS SOUSA** intitulada: **AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÓTOPOS DE *Leishmania* NA ATIVAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR E NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE**, sob orientação da Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Maio de 2020.

Assinatura Eletrônica
29/05/2020 17:37:38.0
VANETE THOMAZ SOCCOL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
29/05/2020 17:29:50.0
DEBORAH CARBONERA GUEDES
Avaliador Externo (MSD SAÚDE ANIMAL)

Assinatura Eletrônica
29/05/2020 17:29:13.0
ALINE KUHN SBRUZZI PASQUALI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
29/05/2020 17:32:16.0
SUSAN GRACE KARP
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

A minha amada esposa, Paola.
Aos meus pais, Gláucia e Augusto.
Aos meus avós e aos meus tios.
Por todo amor, ensino, apoio, incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas portas que me abriu e por sua doce presença me ajudando a prosseguir, mesmo quando eu não fui capaz de notá-lo.

À minha esposa, Paola, que me apoiou durante toda essa caminhada, por todo o seu amor e carinho.

Aos meus familiares, meus pais, meus avós e meus tios que sempre me incentivaram a ir mais adiante e fizeram de tudo para que eu pudesse alcançar meus sonhos.

Agradeço à professora Dra. Vanete Thomaz Soccol pela orientação, pela oportunidade de realizar esse trabalho e por toda a paciência que exigi dela durante o período do mestrado.

Ao departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia por todos os professores e funcionários que prestam seus serviços com toda a sua dedicação.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela amizade companheirismo e troca de conhecimento.

Aos meus amigos de “Jesus na UFPR”, por serem exatamente o que o seu nome diz e abençoarem toda a minha jornada pela UFPR.

Aos meus irmãos da Igreja Presbiteriana Independente do Batel (Antonina - PR) e da Comunidade Alcance de Curitiba que sempre oraram por mim e fortaleceram minha fé.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram mesmo que involuntariamente para a realização deste trabalho.

*“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda ciência;
ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes,
se não tiver amor, nada serei.”*

(Paulo de Tarso)

RESUMO

Leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* Ross, 1903. As duas formas clínicas principais da doença são a leishmaniose cutânea (LC) e a visceral ou kala-azar (LV). A LC é a mais frequente, enquanto a LV é a mais severa, e pode levar à morte se não diagnosticada e tratada a tempo. Em 2016, foram reportados mais de 10 mil casos de LC e mais de 3.000 casos de LV em humanos no Brasil. Cães também são acometidos por essas doenças e representam um importante reservatório, especialmente para a LV. O controle da doença é complexo devido à falta de diagnóstico preciso e medidas de imunoprofilaxia eficientes. Diante desses problemas o presente estudo visou avaliar o potencial de peptídeos mimótopos na ativação da resposta imune celular e no diagnóstico de leishmaniose. Os peptídeos foram obtidos pela técnica de *phage display* utilizando imunoglobulinas G específicas anti-*Leishmania* obtidas a partir da purificação do soro de camundongos Balb-C infectados experimentalmente com *Leishmania amazonensis*. Quatro peptídeos foram selecionados e após serem sintetizados quimicamente, os mesmos foram avaliados quanto à ativação da resposta imune celular pela indução da produção de óxido nítrico em células de macrófagos (Raw 264-7) e quanto à sua utilização no sorodiagnóstico de cães negativos e positivos para LV. Dentre os quatro peptídeos testados, o P2 apresentou os melhores resultados para ativação celular, visto que as células estimuladas com a presença desse peptídeo no meio de cultivo apresentaram uma produção de óxido nítrico cinco vezes superior aos valores obtidos para o controle negativo. Enquanto que nos testes de diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), o peptídeo P1 apresentou os melhores resultados quanto a sensibilidade (92%) e especificidade (76%) em teste ELISA utilizando soros de cinquenta animais positivos e cinquenta animais negativos. Os resultados indicam que os peptídeos obtidos pela técnica de *phage display* são promissores tanto para utilização na formulação de vacinas (P2) ou para utilização no sorodiagnóstico da LVC (P1). Na continuidade dos estudos, é necessário avaliar possíveis modificações que possam otimizar a eficiência dessas moléculas no imunodiagnóstico e imunoprofilaxia da leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose. Phage Display. Peptídeo. ELISA. Imunodiagnóstico. Óxido Nítrico. Imunoprofilaxia.

ABSTRACT

Leishmaniases are diseases caused by more than 20 species of protozoa belonging to the genus *Leishmania* Ross, 1903. The two main clinical forms of the disease are cutaneous leishmaniasis (CL) and visceral or kala-azar (VL). CL is the most frequent, while VL is the most serious, and can lead to death if not diagnosed and treated. In 2016, more than 10,000 cases of CL and more than 3,000 cases of VL were reported in humans in Brazil. Dogs are also affected by this disease and represent an important reservoir for VL. There is great difficulty in the disease control due to the lack of an accurate diagnosis and efficient immunoprophylaxis measures. In view of these problems, the present study aimed to evaluate the potential of mimotope peptides in the activation of cellular immune response and in the diagnosis of leishmaniasis. The peptides were obtained by phage display technique using specific anti-*Leishmania* immunoglobulins G obtained from purified serum of Balb-C experimentally infected with *Leishmania amazonensis*. Four peptides were selected and after being chemically synthesized they were evaluated for cellular immune response activation by inducing the production of nitric oxide in macrophage cells (Raw 264-7) and for their use on serodiagnosis of VL positive and negative dogs. Among the four peptides, P2 showed the best results for cell activation, once the cells stimulated by the presence of this peptide in the culture medium showed a production of nitric oxide five times higher than the values obtained for the negative control. While in the diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis (CVL), P1 showed the best results regarding to sensitivity (92%) and specificity (76%) in ELISA test using sera from fifty positive animals and fifty negative animals. The results indicate that the peptides obtained by phage display technique are promising for their use in vaccines formulation (P2) and in serodiagnosis of CVL (P1). As future prospects, it is necessary to evaluate some modifications on these molecules to optimized them and achieve a better efficacy on leishmaniases diagnosis and immunoprophylaxis.

Keywords: Leishmaniasis. Phage Display. Peptide. ELISA. Immunodiagnosis. Nitric Oxide. Immunoprophylaxis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FORMA AMASTIGOTA DE LEISHMANIA spp. PRESENTE EM CÉLULAS DO SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR.	21
FIGURA 2 - FORMA PROMATIGOTA DE LEISHMANIA spp. PRESENTE NO INTESTINO DO INSETO VETOR.....	22
FIGURA 3 – FEMEA DE <i>Lutzomyia longipalpis</i> FAZENDO REPASTO SANGUÍNEO.	23
FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DE <i>Leishmania</i> spp. NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO PORTADORES DAS FORMAS AMASTIGOTAS EM CÉLULAS DO SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR E EM VETORES CUJAS FORMAS PROMASTIGOTAS ESTÃO NO INTESTINO.	24
FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE NOVOS CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM 2016.....	25
FIGURA 6 - PACIENTE COM LEISHMANIOSE VISCERAL EM ESTÁGIO AVANÇADO.	26
FIGURA 7 - CÃES COM LVC.	27
FIGURA 8 - PRINCIPAIS ETAPAS PARA A SELEÇÃO E TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PEPTÍDEOS MIMOTOPOS.	38
FIGURA 9 - ETAPA INICIAL DA TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY.....	45
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TESTE ELISA PARA AVALIAR A IMUNOREATIVIDADE DOS CICLOS DE SELEÇÃO.	46
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TESTE ELISA PARA SELEÇÃO DOS FAGOS.	47
FIGURA 12 - SDS-PAGE DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE <i>L. amazonensis</i>	52
FIGURA 13 - CAMUNDONGOS BALB C APRESENTANDO LESÕES CARACTERÍSTICAS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL.....	53
FIGURA 14 - SDS-PAGE DO TOTAL DE IgGs DE CAMUNDONGOS BALB C INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM <i>L. amazonensis</i> E PURIFICADOS POR SULFATO DE AMÔNIO E CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	54
FIGURA 15 - REATIVIDADE DAS IgGs ANTI- <i>L. amazonensis</i> DE BALB C INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CONTRA ANTÍGENO DE <i>L. amazonensis</i>	55
FIGURA 16 - REAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO POR TESTE ELISA, MOSTRANDO O AUMENTO DA REATIVIDADE EM CADA CICLO DE SELEÇÃO.	56
FIGURA 17 - TESTE ELISA PARA SELEÇÃO DOS FAGOS REAGENTES CONTRA SOROS DE ANIMAIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CONTENDO ANTICORPOS ANTI- <i>Leishmania</i>	57
FIGURA 18 - CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	61
FIGURA 19 - DOSAGEM DE NITRITO (48 h).	61
FIGURA 20 - DOSAGEM DE NITRITO (72 h).	62
FIGURA 21 - TESTE ELISA PARA AVALIAR A CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS.....	63

FIGURA 22 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA O PEPTÍDEO 1.....	64
FIGURA 23 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA O PEPTÍDEO 2.....	65
FIGURA 24 - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO P1 PARA LVC.....	66
FIGURA 25 - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO P2 PARA LVC.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MÉDIA DAS ABSORBÂNCIAS DOS SOROS DOS ANIMAIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE A CADA COLETA.....	53
TABELA 2 - ENTRADA E SAÍDA DOS FAGOS OBTIDOS POR BIOPANNING USANDO PHAGE DISPLAY COM ANTICORPOS ANTÍGENO ESPECÍFICOS.....	55
TABELA 3 - SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS POR PHAGE DISPLAY.....	57
TABELA 4 - HOMOLOGIA DE PROTEÍNAS DE <i>Leishmania</i> spp. EM RELAÇÃO AO PEPTÍDEO 1.....	58
TABELA 5 - HOMOLOGIA DE PROTEÍNAS DE <i>Leishmania</i> spp. EM RELAÇÃO AO PEPTÍDEO 2.....	58
TABELA 6 - HOMOLOGIA DE PROTEÍNAS DE <i>Leishmania</i> spp. EM RELAÇÃO AO PEPTÍDEO 3.....	58
TABELA 7 - HOMOLOGIA DE PROTEÍNAS DE <i>Leishmania</i> spp. EM RELAÇÃO AO PEPTÍDEO 4.....	59
TABELA 8 - PREDIÇÃO DE PEPTÍDEOS INDUTORES DE IFN- γ	60
TABELA 9 - PREDIÇÃO DE PEPTÍDEOS INDUTORES DE IL-4.....	60
TABELA 10 - QUANTIDADE DE NITRITO PRODUZIDA PELAS CÉLULAS APÓS 48h DE INDUÇÃO.....	61
TABELA 11 - QUANTIDADE DE NITRITO PRODUZIDA PELAS CÉLULAS APÓS 72h DE INDUÇÃO.....	62
TABELA 12 - ELISA SCORE.....	63
TABELA 13 - COMPARAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ENTRE DIFERENTES ESTUDOS ENVOLVENDO O DIAGNÓSTICO DE LVC.....	71

LISTA DE SIGLAS

- AS – Antígeno Solúvel
- BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio
- BSA – Albumina de Soro Bovino
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CCZ – Centro de Controle de Zoonoses
- DAB - 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto
- DAT – Teste de Aglutinação Direta
- DEBB – Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- DPP – Teste imunocromatográfico *Dual Path Platform*
- ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
- Fc – Fragmento cristalizável
- FML – Proteína Ligante de Fucose e Manose
- Fmoc – cloroformiato de 9-fluorenilmetila
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- IEDB – *Immune Epitope Database*
- IFI – Imunofluorescência Indireta
- IFN- γ – Interferon gama
- IgG – Imunoglobulina G
- IL - Interleucina
- iNOS - óxido nítrico sintase induzível
- kDNA - Ácido Desoxirribonucléico de quinetoplasto
- LB – Luria Bertani
- Lbk39 - proteína recombinante baseada em um gene relacionado a cinesina de *L. braziliensis*
- LC – Leishmaniose Cutânea
- LIT - *Liver Infusion Tryptose*
- LM – Leishmaniose Mucosa
- LPS - Lipopolissacarídeo
- LT – Leishmaniose Tegumentar

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LV – Leishmaniose Visceral
LVC – Leishmaniose Visceral Canina
mRNA – ácido ribonucléico mensageiro
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
NNN - Neal, Novy e Nicolle
NO – Óxido Nítrico
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPD – Dicloridrato De O-Fenilendiamina
PAGE – Eletroforese Em Gel de poliacrilamida
PBS – Tampão Fosfato Salino
PBST – Tampão Fosfato Salino com Tween
PCR – Reação em Cadeia da polimerase
PEG – Polietileno Glicol
PVDF – Fluoreto de polivinilideno
P1 – Peptídeo 1
P2 – Peptídeo 2
P3 – Peptídeo 3
P4 – Peptídeo 4
qPCR – Reação em Cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
rK39 – Proteína Recombinante K39
RPMI –
SDS – Sódio Dodecil Sulfato - Eletroforese em gel de Poliacrilamida
TBS – Solução Salina Tris tamponada
TBS – Tampão Tris Salino com Tween
TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta
Th – *T helper*
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
UFPR – Universidade Federal do Paraná

LISTA DE SIMBOLOS

ng – Nanograma

µg – Micrograma

mg – Miligrama

g – grama

cm - Centímetro

nm – Nanômetro

mm – Milímetro

µm – Micrômetro

µL – Microlitro

mL – Mililitro

L – Litro

nM – Nanomolar

mM – Milimolar

µmol – micromol

M - Molar

m/v – Massa por volume

U – Atividade enzimática

min - Minuto

h - Horas

g – Aceleração da gravidade na superfície da Terra

rpm – Rotações por minuto

°C – Graus Celsius

pH – Potencial Hidrogeniônico

kDa - Quilodalton

% - Porcentagem

™ - Trade Mark

® - Registrado

V - Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	AGENTE ETIOLÓGICO	21
3.2	VETOR	22
3.3	CICLO EVOLUTIVO DE <i>Leishmania</i>	23
3.4	LEISHMANIOSE VISCERAL	24
3.4.1	Epidemiologia	24
3.4.2	Manifestações Clínicas	25
3.4.3	Tratamento	27
3.5	DIAGNÓSTICO	28
3.6	VACINAS	32
3.7	PHAGE DISPLAY	34
3.8	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS DE <i>Leishmania amazonensis</i>	38
4.2	AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>L. amazonensis</i>	39
4.3	INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM <i>Leishmania amazonensis</i>	40
4.4	SELEÇÃO DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS INFECTADOS	41
4.5	PRECIPITAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI- <i>LEISHMANIA</i> COM SULFATO DE AMÔNIO	42
4.6	SDS-PAGE PARA AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS APÓS PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO	42
4.7	OBTENÇÃO DA SUBCLASSE DE IMUNOGLOBULINAS G	42
4.8	OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G ANTI- <i>L. amazonensis</i>	43
4.9	<i>PHAGE DISPLAY</i> : EXPRESSÃO DE PEPTÍDEO EM SUPERFÍCIE DE FAGO	44

4.10 REATIVIDADE DOS CONJUNTOS DE FAGOS A CADA ETAPA DE SELEÇÃO POR TESTE ELISA.....	46
4.11 TRIAGEM DOS CLONES DE FAGOS	46
4.12 OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS PEPTÍDEOS	47
4.13 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS.....	48
4.14 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS PEPTÍDEOS MIMOTOPOS OBTIDOS	48
4.15 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	49
4.16 TESTE IMUNOENSAIO (ELISA).....	50
5 RESULTADOS	52
5.1 ANTÍGENOS.....	52
5.2 INFECÇÃO DOS ANIMAIS COM <i>Leishmania amazonensis</i>	52
5.3 IMUNOGLOBULINAS G PURIFICADAS DE ANIMAIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE	53
5.4 IMUNOGLOBULINAS G ANTI- <i>Leishmania amazonensis</i>	54
5.5 PHAGE DISPLAY.....	55
5.6 SELEÇÃO DOS CLONES	56
5.7 SEQUÊNCIA DOS PEPTÍDEOS	57
5.8 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS PEPTÍDEOS PARA AVALIAR A RESPOSTA IMUNE.....	60
5.8.1 Predição dos epítomos indutores de IFN- γ	60
5.8.2 Predição de epítomos indutores de IL-4.....	60
5.9 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO.....	60
5.10 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	62
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* Ross, 1903. Esses parasitos são transmitidos pela hematofagia de fêmeas de flebotomíneos, pertencentes à sub-família Phlebotominae e ao gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (YOUNG; DUNCAN, 1994; WHO, 2018).

As duas principais formas clínicas da doença são a leishmaniose cutânea (LC), e a visceral ou kala-azar (LV). A LC é a mais frequente, enquanto a LV é a mais grave, podendo levar à morte se não diagnosticada e tratada. Em 2016, essas duas formas foram classificadas como endêmicas sendo a primeira em 87 e a segunda em 75 países dos 200 que reportam casos autóctones à OMS, respectivamente. No mesmo ano, mundialmente foram reportados 200.918 novos casos de LC, e 22.233 de LV. No Brasil foram reportados mais de 10 mil casos de LC e mais de 3.000 casos de LV (WHO, 2018).

A LV tem como principal agente etiológico, na América Latina, a espécie *Leishmania infantum*, (BRASIL, 2014). Na área urbana, os cães são reservatórios do parasito, e a frequente incidência da doença nesses animais precede a infecção em seres humanos. No Brasil, a transmissão ocorre, em sua maioria, pelo vetor *Lutzomyia longipalpis* (BRASIL, 2014). Essa doença, em humanos, é caracterizada por surtos irregulares de febre, perda substancial de peso, hepatoesplenomegalia e anemia, podendo levar o paciente a óbito se não tratada (BRASIL, 2014; WHO, 2018).

Já nos cães, a leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta um quadro clínico que vai desde animais aparentemente saudáveis à animais em severo estágio final. As manifestações clínicas da doença estão fortemente ligadas à resposta imune dos animais. A LVC pode apresentar lesões cutâneas e mucosas, principalmente no nariz e na orelha, úlceras rasas e pelo opaco. Além de sinais característicos, nos casos mais avançados pode-se observar onicogribose, ceratoconjuntivite, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. E nos estágios finais ocorre em geral paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte. Porém, alguns cães infectados podem permanecer sem apresentar sinais clínicos por longos períodos de tempo (BRASIL, 2014).

O diagnóstico das leishmanioses inicialmente é feito por exame clínico, epidemiológico, sendo confirmados por exames diretos (parasitológicos e histopatológicos) e indiretos (exames imunológicos) (BRASIL, 2014; CHAPPUIS et al.,

2007). Esses últimos consistem na detecção de anticorpos específicos contra *Leishmania* spp. e têm sido preferidos por serem rápidos e menos invasivos (BRASIL, 2017).

Dentre as ferramentas de diagnóstico da LV, destacam-se os testes imunocromatográficos, baseados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro do paciente humano ou animal. Sua praticidade e rapidez em fornecer um diagnóstico e a possibilidade de utilização em regiões de mais difícil acesso são as principais características que tornam estes testes tão importantes. No Brasil, existem poucos testes imunocromatográficos disponíveis, alguns deles pouco avaliados quanto à sua sensibilidade e especificidade, fatores esses que contribuem para a continuidade da negligência em relação a essa doença (FREIRE, 2017). Existe muita variação na eficiência destes testes de acordo com o grau de endemicidade das regiões onde são aplicados. Além disso, a existência de reações cruzadas também pode interferir nos resultados destes testes imunocromatográficos. Nos animais, os métodos de diagnóstico são semelhantes aos utilizados nos seres humanos, destacando-se também o teste imunocromatográfico. Porém, devido à insuficiência de acurácia no diagnóstico, o programa de controle da doença no Brasil tem enfrentado dificuldades em combatê-la e diminuir a incidência de novos casos. Por isso se faz necessária a otimização dos testes existentes e o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico especialmente em cães, que são o principal reservatório da LV. A busca por novos antígenos, capazes de diferenciar os soros positivos de soros negativos com consistência e que possuam alta sensibilidade e especificidade, é uma das principais vias para otimização dos testes imunológicos (ROMERO; BOELAERT, 2010; PEIXOTO et al., 2015).

A identificação de epítomos de proteínas capazes de induzir uma resposta imune, ou de detectar anticorpos específicos é um objetivo essencial no controle das leishmanioses. Em décadas recentes, um grande número de moléculas tem sido descritas com potencial para serem utilizadas como antígeno para o sorodiagnóstico de leishmaniose, incluindo algumas que são moléculas purificadas ou frações solúveis do parasito. Adicionalmente, antígenos produzidos por engenharia genética vêm sendo investigados e validados para pesquisas com anticorpos contra *Leishmania* spp. (ZANETTI et al., 2019; LÉVÊQUE et al., 2020). Entretanto, esses antígenos ainda requerem adequação quanto aos seus valores de sensibilidade e especificidade para uso em diagnóstico e imunoproteção.

A tecnologia de *phage display* representa uma alternativa quando se trata de pesquisa por novos alvos antigênicos. O peptídeo ou proteína expressa na superfície de cada partícula de fago permite a seleção de sequências baseada na afinidade de ligação

a anticorpos através de um processo de seleção *in vitro* chamado de *biopanning*. A tecnologia também permite a seleção de antígenos úteis para o desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas (ALBAN et al., 2013; TOLEDO-MACHADO et al., 2015, LINK et al., 2017).

Este estudo visa buscar novos antígenos pela técnica de phage display, os quais apresentem-se viáveis para o diagnóstico e imunoprofilaxia da leishmaniose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo visa selecionar e avaliar peptídeos sintéticos, após obtenção por *phage display*, que possam ser utilizados especificamente para o sorodiagnóstico ou imunoprevenção contra leishmaniose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção do antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis*.
- Purificação de Imunoglobulinas G específicas contra *Leishmania amazonensis* a partir de soro de camundongos infectados experimentalmente;
- Seleção dos fagos reagentes pela técnica de ELISA frente a soro de animais contendo anticorpos anti-*Leishmania*;
- Síntese dos peptídeos apresentados pelos fagos reagentes;
- Avaliação da ativação da resposta celular induzida pelos peptídeos;
- Avaliação da eficácia dos peptídeos no sorodiagnóstico de LVC pela técnica de ELISA.

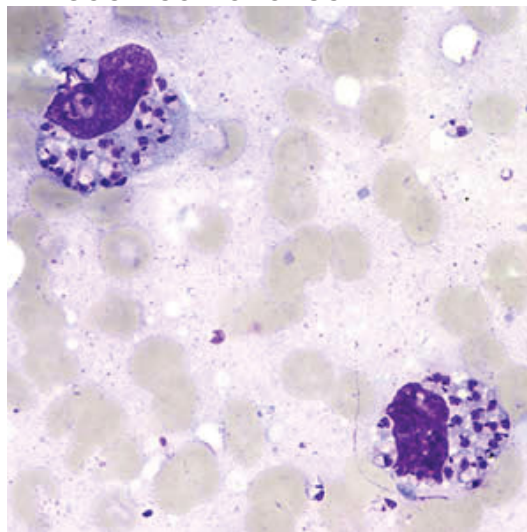
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Os parasitos causadores de leishmanioses são protozoários da família Trypanosomatidae, pertencendo ao gênero *Leishmania*. Este gênero é caracterizado por apresentar duas formas durante o seu ciclo de vida: a forma amastigota, na qual os parasitos são intracelulares especialmente em células do sistema fagocítico mononuclear, de hospedeiros vertebrados; e a forma promastigota, que se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados, tal qual quando cultivados em meio de cultura (REY, 2008).

A forma amastigota (FIGURA 1), aflagelada, possui de 2 a 6 μm de comprimento e 1,5 a 3 μm de largura, sendo um dos menores protozoários a parasitar o ser humano. Elas são encontradas nos vacúolos digestivos de macrófagos, do hospedeiro vertebrado, que fagocitam o parasito. São caracterizadas por apresentar um citossomo levemente achatado, de contorno ovoide (REY, 2008).

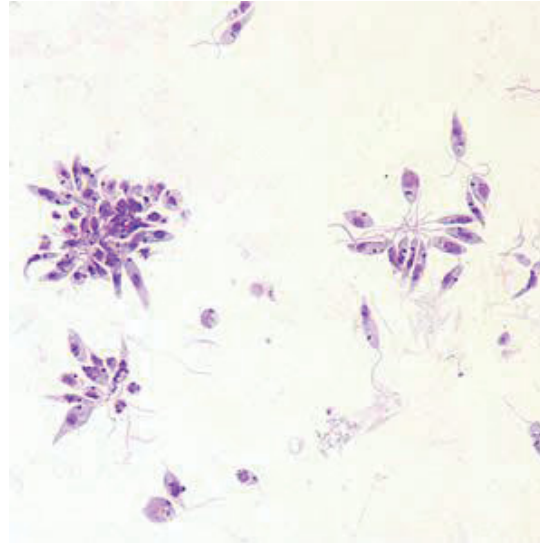
FIGURA 1 – FORMA AMASTIGOTA DE *LEISHMANIA* spp. PRESENTE EM CÉLULAS DO SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR.



FONTE: CDC, 2017.

As formas promastigotas (FIGURA 2), flageladas, são encontradas no tubo digestivo do vetor, onde as formas amastigotas se diferenciam para promastigotas. Elas possuem um formato fusiforme com a extremidade anterior arredondada, enquanto a extremidade posterior é mais afinada. Elas variam de 14 a 20 μm de comprimento e 1,5 a 4 μm de largura (REY, 2008).

FIGURA 2 - FORMA PROMATIGOTA DE *LEISHMANIA* spp. PRESENTE NO INTESTINO DO INSETO VETOR.



FONTE: CDC, 2017.

3.2 VETOR

As diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas pertencentes à subfamília Phlebotominae (WHO, 2018). As espécies de flebotomíneos são encontradas em regiões temperadas, a maioria em regiões tropicais ou subtropicais (BRAZIL; RODRIGUES; FILHO, 2015). No continente americano existem aproximadamente 530 espécies de flebotomíneos descritas (SHIMABUKURO; DE ANDRADE; GALATI, 2017). Porém, pouco mais de 20 espécies são comprovadamente consideradas vetores de *Leishmania* spp., dentre as quais, se destacam como os principais vetores, invertebrados dos gêneros *Phlebotomus*, no velho mundo, e *Lutzomyia*, no novo mundo (YOUNG; DUNCAN, 1994; REY, 2008; BRAZIL; RODRIGUES; FILHO, 2015). As principais espécies responsáveis pela transmissão do parasito no Brasil são, nos casos de LC, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Ny. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* (BRASIL, 2017). Já nos casos de LV e LVC no Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão são *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi* (BRASIL, 2014).

Flebotomíneos são pequenos dípteros, pilosos com coloração castanho-clara ou cor de palha, o que lhes confere um nome popular de mosquito palha. Esses insetos, quando pousados, costumam manter as asas entreabertas e levemente levantadas (REY, 2008; BRAZIL; RODRIGUES; FILHO, 2015).

FIGURA 3 – FEMEA DE *Lutzomyia longipalpis* FAZENDO REPASTO SANGUÍNEO.

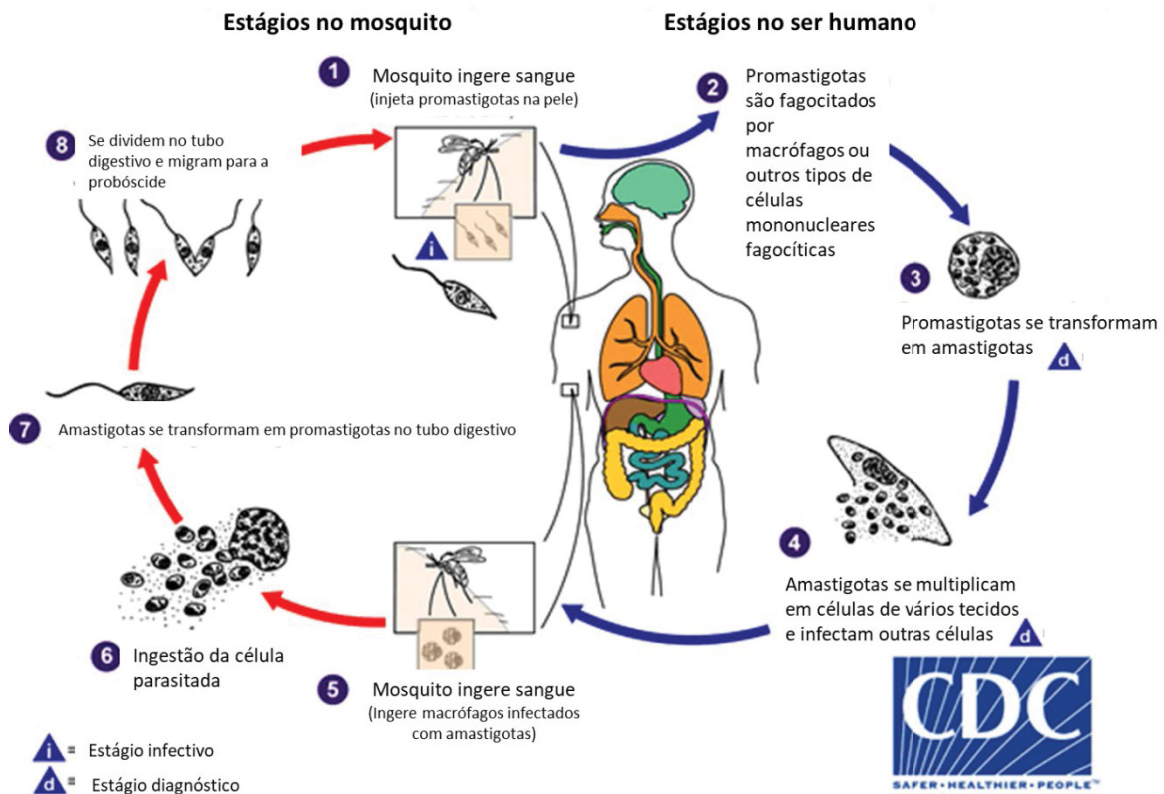
FONTE: Ray Wilson, Liverpool School of Tropical Medicine, 2009.

3.3 CICLO EVOLUTIVO DE *Leishmania*

Quando a fêmea do vetor (flebotomíneo) infectada realiza a hematofagia em um hospedeiro, os parasitos se multiplicam no intestino do vetor e. Após a inoculação do parasito na forma promastigota, estes são fagocitados por células como macrófagos e neutrófilos, onde se transformam em amastigotas e se multiplicam causando o rompimento celular. Esses parasitos livres vão infectar outras células do organismo do hospedeiro (REY, 2008).

Quando o vetor realiza a hematofagia em um hospedeiro infectado, ele ingere formas amastigotas, que se converterão em amastigotas no seu tubo digestivo. Estas se multiplicarão até que haja uma carga parasitária tão alta que cause uma obstrução mecânica da probóscide. A dificuldade de ingestão de sangue pelo flebotomíneo demandará mais esforço para sua alimentação, culminando no eventual relaxamento dos músculos de sucção e na regurgitação desses parasitos no indivíduo picado (BATES; ROGERS, 2004; REY, 2008). O ciclo de vida do parasito está representado na FIGURA 4.

FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DE *Leishmania* spp. NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO PORTADORES DAS FORMAS AMASTIGOTAS EM CÉLULAS DO SISTEMA FGCÍTICO MONONUCLEAR E EM VETORES CUJAS FORMAS PROMASTIGOTAS ESTÃO NO INTESTINO.



FONTE: Adaptado do CDC, 2017.

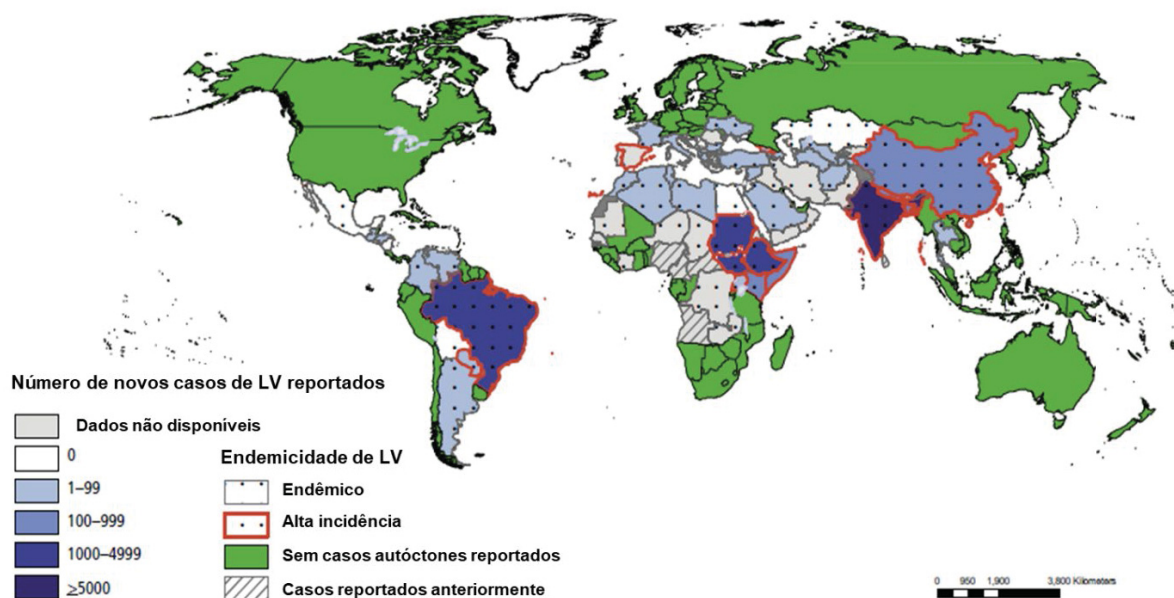
3.4 LEISHMANIOSE VISCERAL

3.4.1 Epidemiologia

Leishmanioses são doenças infecciosas, tropicais e subtropicais, que figuram entre as principais de maior impacto global, devido ao seu alto coeficiente de detecção e sua capacidade de produzir deformidades ou até causar a morte em um indivíduo. Estima-se que surjam aproximadamente de 0,9 a 1,6 milhões de casos por ano, considerando a alta taxa de subnotificação (ALVAR, 2012; BRASIL, 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Consideradas como uma doenças negligenciadas, as leishmanioses possuem forte e complexa relação com a pobreza, devido a fatores como condições precárias de habitação e saneamento básico, falta de medidas pessoais de prevenção, maior exposição ao vetor, nutrição defasada e falta de cuidados com a saúde. Além do fato de que o alto custo dos diagnósticos e tratamento de leishmaniose dificultam ainda mais o acesso a esses serviços (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

Em 2016, dos 200 países ou territórios que se reportam à OMS, 75 (38%) foram considerados endêmicos para LV, enquanto sete (4%) desses países já haviam reportado casos anteriormente. Neste mesmo ano, 22.233 casos de LV foram reportados à OMS, 15% deles na região das Américas, onde o Brasil também se mostra como um dos principais afetados pela doença, com mais de 3.000 casos registrados (FIGURA 5) (WHO, 2018). Somente no ano de 2018, foram registrados 3.466 novos casos de LV no Brasil (BRASIL, 2020a).

FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE NOVOS CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM 2016.



FONTE: Adaptado de WHO, 2018.

A LV tem como principal agente etiológico *Leishmania donovani* na Ásia e *Leishmania infantum* na América Latina. Na área urbana, os cães são os principais reservatórios do parasito, e a frequente incidência da doença nesses animais precede a infecção de seres humanos (BRASIL, 2014; BISELTO JUNIOR et al., 2015).

3.4.2 Manifestações Clínicas

Ela possui períodos de incubação variados tanto para o homem, de 10 dias a 24 meses, quanto para cães, de 3 meses a vários anos. Porém, a média varia de 2 a 6 meses para humanos e de 3 a 7 meses para cães (BRASIL, 2014; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A proliferação de parasitos em macrófagos do fígado, baço e medula óssea causa hepato-esplenomegalia e supressão da medula óssea em pacientes de LV (McGWIRE; SATOSKAR, 2013). As manifestações clínicas mais comuns em humanos são surtos irregulares de febre, perda substancial de peso, aumento do baço e do fígado e anemia, podendo levar o paciente à morte caso a infecção não seja tratada (BRASIL, 2014; WHO, 2018). Pessoas imuno suprimidas, como pacientes com HIV, apresentam maior suscetibilidade a essa doença, podendo apresentar manifestações atípicas e aumento da severidade devido à desregulação do sistema imune (BRASIL, 2014; McGWIRE; SATOSKAR, 2013). Existem casos de LV causada por espécies usualmente relacionadas a LC, como *Leishmania braziliensis* em pacientes com HIV (SILVA et al., 2002). Essa doença é a segunda mais letal dentre as doenças causadas por infecções parasitárias, causando 62.500 mortes em 2013, atrás apenas da malária (NAGHAVI et al, 2015).

FIGURA 6 - PACIENTE COM LEISHMANIOSE VISCERAL EM ESTÁGIO AVANÇADO.



FONTE: BRASIL, 2014.

Na leishmaniose visceral canina (LVC), pode ser observado três manifestações clínicas, sendo assintomático (ausência de sinais clínicos), oligosintomático (apresentação de alguns sinais clínicos) e sintomático (todos ou os principais sinais clínicos). As manifestações clínicas da doença estão fortemente ligadas à resposta imune dos animais. Dentre essas manifestações a LVC pode causar sinais neuromusculares como pareseia, convulsão, atrofia muscular; adenomegalia; Sinais oftalmológicos como blefarite, uveíte, conjuntivite e ceratite; sinais na mucosa como palidez, epistaxe, úlceras e nódulos; sinais dérmicos como eritema, prurido, alopecia, hiperqueratose e onicogrifose; além de outros sinais como vômito, diarreia, insuficiência renal, artrose e hepatoesplenomegalia (FIGURA 7). E nos estágios finais ocorre em geral paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Porém, cães assintomáticos infectados

podem permanecer sem apresentar sinais clínicos por longos períodos de tempo (ALVAR et al., 2004; BRASIL, 2014; BISETTO JUNIOR et al., 2015).

FIGURA 7 - CÃES COM LVC.



FONTE: Adaptado de BISETTO JUNIOR et al., 2015.

NOTA: Cão sintomático corpo (A); oncogribose (B); Descamação da pele (C); Caquexia (D); Descamação da pele e lesão em articulação (E).

Animais assintomáticos, apesar de não apresentarem sinais clínicos da doença, podem ser altamente parasitados, e portanto, uma fonte de contaminação do vetor, aumentando ainda mais a importância dos cães como reservatórios do parasito (LOPES, 2014). A grande parcela de animais assintomáticos e oligossintomáticos dificulta o diagnóstico clínico (ALVAR et al., 2004; BRASIL, 2014; BISETTO JUNIOR et al., 2015).

3.4.3 Tratamento

Os antimoniais pentavalentes (Sb+5) são as principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses humana. Portanto, são consideradas a primeira escolha no tratamento dos pacientes humanos (TORRES-GUERRERO, 2017). Atualmente existem dois tipos de antimoniais pentavalentes disponíveis no mercado: o antimoniato de meglunina e o estibogluconato de sódio, que não é comercializado no Brasil. Outras drogas que se destacam como tratamentos alternativos, em casos em que o tratamento com os antimoniais não foi totalmente eficaz, ou então em casos nos quais existem contraindicações no uso dos antimoniais, são a anfotericina B e as pentamidinas, como isotionato e mesilato de pentamidina. A anfotericina é indicada como a principal droga no tratamento de gestantes infectadas por *Leishmania* spp. Todas essas drogas possuem

efeitos adversos nocivos à saúde do paciente, fato que reforça a necessidade de investimento na prevenção das leishmanioses (BRASIL, 2014, 2017).

Já no caso de cães, em 2016 foi autorizado por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde o uso da Miltefosina para o tratamento de cães que estejam acometidos de LVC (BRASIL, 2016a). A Miltefosina é a única droga usada para o tratamento de cães e resulta em redução dos sinais clínicos apresentados, redução da carga parasitária e também da infectividade desses animais em relação ao vetor, porém o tratamento não resulta em cura parasitológica, sendo necessário medidas de prevenção para evitar o contato do animal sob tratamento com o vetor da doença (NOGUEIRA et al., 2019).

3.5 DIAGNÓSTICO

Inicialmente, a suspeita clínica é fundamental para o diagnóstico da leishmaniose, seguida da análise epidemiológica, que são dados de grande importância para identificação das regiões endêmicas. Relatos de viagens a essas áreas podem auxiliar na investigação de um caso suspeito da doença (CERUTTI et al., 2017). Contudo, o avanço do ciclo parasitário para o perímetro urbano torna cada vez mais provável a infecção de pacientes sem histórico de viagens a áreas endêmicas (MAGALHÃES; MOURA, 2015). Além disso, a identificação dos parasitos predominantes na região pode ser importante com relação ao desenvolvimento de lesões e a resistência a drogas no tratamento (CERUTTI et al., 2017).

O diagnóstico de LV pode ser feito por exames parasitológicos, utilizando punção de medula óssea, linfonodo ou baço, sendo que o mais seguro é punção de medula óssea. Esses procedimentos devem ser realizados em ambientes hospitalares para a redução máxima de contaminação (BRASIL, 2016b). Uma gota do material aspirado é fixada e corada adequadamente para então ser observada em microscópio óptico. Os fragmentos contendo as formas amastigotas ainda podem ser inoculados em meio de cultivo, como NNN, e incubados a 24°C, observando-se semanalmente por até 4 semanas. Os tubos positivos devem ser encaminhados para a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida, por técnicas de biologia molecular, e os demais devem ser repicados e observados por microscopia semanalmente.

A demonstração indireta do parasito pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase – Polymerase Chain Reaction), técnica baseada na amplificação do material

genético do parasito em diferentes tipos de amostras. Este método possui alta sensibilidade e especificidade e utiliza diversos alvos moleculares sendo que alguns são gênero-específicos e outros são espécie-específicos. Uma das vantagens do uso dessa técnica é a capacidade de detecção mesmo quando há baixa carga parasitária. Porém, devido à complexidade de execução, alto custo e a necessidade de infraestrutura laboratorial adequada dificultam sua aplicação em áreas endêmicas (BRASIL, 2014).

Exames imunológicos consistem na detecção de anticorpos específicos contra *Leishmania*. Testes como a imunofluorescência indireta (IFI), a aglutinação direta (DAT), o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), testes imunocromatográficos e Western Blot são amplamente utilizados em áreas endêmicas para o diagnóstico de LV (LÉVÊQUE et al., 2020). Dentre as ferramentas de diagnóstico da LV destacam-se os testes imunocromatográficos, que consistem em uma membrana de nitrocelulose com antígeno, geralmente a proteína recombinante K39 de *Leishmania* (rK39), fixado que realizará a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro do paciente. Por conta de sua praticidade e rapidez em fornecer um diagnóstico, geralmente é usado em regiões de mais difícil acesso a serviços de saúde e fornece resultados em um curto período (WHO, 2010). Porém, apesar de haver uma diminuição na quantidade de anticorpos após um tratamento bem sucedido, eles ainda são detectáveis, dificultando o diagnóstico em casos de uma possível reincidência da doença, além de existirem muitos casos em que indivíduos saudáveis são diagnosticados positivamente devido a infecções assintomáticas. Portanto, esses testes devem ser sempre acompanhados do diagnóstico clínico (BRASIL, 2014; CHAPPUIS et al., 2007). No Brasil, existem poucos testes imunocromatográficos, e alguns deles pouco avaliados quanto à sua sensibilidade e especificidade, fatores que contribuem para a continuidade da negligência em relação a essa doença (FREIRE, 2017).

Devido às reações cruzadas com infecções causadas por outras espécies de parasitos nos testes sorológicos, a busca por novos antígenos, como a proteína rK39, capazes de reduzir a quantidade dessas reações e tornar os testes mais sensíveis e específicos, vem ganhando grande importância no diagnóstico de LV (MAIA et al., 2012; LÉVÊQUE et al., 2020). Lakhal et al. (2012), identificaram maior sensibilidade (97,6%) e especificidade (100%) em teste ELISA utilizando extratos de histonas de *Leishmania* quando comparado a testes utilizando antígeno solúvel preparado a partir de *L. infantum*. Vários estudos utilizando diferentes antígenos recombinantes para o diagnóstico de LV têm apresentado sensibilidade e especificidade acima de 95%, o que indica um grande potencial para sua utilização (LÉVÊQUE et al., 2020).

Além das proteínas inteiras, outras estratégias podem ser usadas como os peptídeos sintéticos que se apresentam como potencialmente mais estáveis, baratos e fáceis de produzir. Alguns desses peptídeos apresentam bom desempenho no diagnóstico de LV e com poucas reações cruzadas com soros de pacientes infectados por outros parasitos (MENEZES-SOUZA et al., 2015; COSTA et al., 2017; CARVALHO et al., 2018).

Em cães, os métodos de diagnóstico são semelhantes aos utilizados nos seres humanos. Podem também ser baseados em exames parasitológicos e sorológicos. A obtenção do material biológico para a realização dos exames parasitológicos é feita a partir de punções de linfonodos, de medula óssea e biópsia ou escarificação da pele. Esse método costuma ser simples e muito seguro, pois os resultados positivos são baseados na observação direta do parasito na sua forma amastigota, com 100% de especificidade, enquanto que a sensibilidade fica em torno de 80% em cães sintomáticos e menor ainda em cães assintomáticos, visto que o diagnóstico depende do grau de parasitemia, tipo de material biológico e tempo de leitura da lâmina. Entretanto, esses procedimentos consistem em métodos invasivos, significando certo risco para o animal, além de serem impraticáveis pelos programas de saúde em regiões onde há grande quantidade de animais que necessitam ser avaliados em curto período de tempo (BRASIL, 2014; BISELTO JUNIOR et al., 2015).

Os diagnósticos parasitológicos indiretos baseados em técnicas moleculares, como PCR utilizando DNA de quinetoplasto de *Leishmania* (kDNA) como alvo, possuem regularmente alta especificidade (de 95% a 100%). Já a sensibilidade costuma variar de 89 a 100% para animais sintomáticos, porém esse valor diminui quando a técnica é aplicada em animais assintomáticos (TRAVI et al., 2018). A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é considerada um dos métodos mais confiáveis devido à sua alta sensibilidade. Em estudo comparando diferentes testes moleculares e avaliando amostras de 67 cães a qPCR apresentou sensibilidade de 91% enquanto que a PCR convencional de kDNA apresentou sensibilidade de 72% (CARSON et al., 2010).

Dentre os testes sorológicos utilizados rotineiramente para o diagnóstico de LVC estão a IFI, ELISA e testes rápidos, como testes imunocromatográficos, que se destacam por conta de sua praticidade e velocidade em apresentar resultado. Estes últimos têm a vantagem de aumentar a acurácia do diagnóstico de LVC, se usados em conjunto com teste ELISA para confirmação (COURA-VITAL et al., 2014). Essa combinação do uso do teste imunocromatográfico, seguido pela confirmação por ELISA, é a recomendação oficial do ministério da saúde para o diagnóstico de LVC no Brasil segundo a nota técnica

conjunta nº 01/2011 – CGDT – CGLAB/DEVIT/SVS/MS (BISETO JUNIOR et al., 2015; BRASIL, 2016b). Em um estudo realizado por Ribeiro et al. (2019), 189 soros de cães, sendo 47 negativos e 142 positivos para infecção com *L. infantum*, foram avaliados por IFI e cinco testes rápidos: ELISA Bio-Manguinhos, rapid ELISA IDEXX (SNAP *Leishmania*), Kalazar Detect™ (InBios International, Inc.), ALERE® Leishmaniasis AC test kit e DPP® Bio-Manguinhos. Os melhores resultados deste estudo foram obtidos pelo DPP®, visto que este apresentava sensibilidade de 97,9% e especificidade de 93,6% (RIBEIRO et al., 2019). Apesar dos avanços alcançados, ainda existe muita variação na eficiência desses testes, diminuindo assim sua precisão no diagnóstico. Um dos fatores que contribuem para essas variações são reações cruzadas com outras espécies de Tripanossomídeos, como *T. cruzi*, que podem ocorrer, dificultando o desempenho do programa de controle da doença no Brasil. Por isso, se faz necessária a otimização dos testes existentes e o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico no Brasil (ZANETTE et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015).

Muitos antígenos vêm sendo estudados a fim de aumentar a acurácia dos exames sorológicos. Esses antígenos, como proteínas recombinantes, apresentam melhores resultados quanto a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade do que os antígenos convencionais. Dentre eles, o mais estabelecido é a rK39, apresentando sensibilidade de 97,2 a 100% e especificidade de 100 % em testes ELISA realizados no Brasil (PEIXOTO et al., 2015; TRAVI et al., 2018). Contudo, o desempenho desses antígenos decai muito, com sensibilidade de 66% e especificidade de 71%, quando aplicados a testes com amostras de animais assintomáticos ou acometidos de outras infecções, indicando a presença de reações cruzadas (PORROZZI et al., 2007). A variabilidade da eficiência dos testes envolvendo a proteína rK39 instiga a busca por outros antígenos que melhorem ainda mais a avaliação de animais sintomáticos e assintomáticos. Algumas técnicas utilizam a combinação de antígenos para otimizar os resultados de modo a superar os resultados que cada um tenha apresentado individualmente, como a combinação entre rK26 e rKLO8 que apresentou sensibilidade de 85% e especificidade de 93%, enquanto que individualmente os valores de sensibilidade e especificidade de cada um foram menores (ABAD et al., 2017). Outras abordagens que também vêm sendo desenvolvidas são proteínas quiméricas apresentando multiepítopos, desenhadas para aumentar a detecção de animais assintomáticos infectados. Também, o uso avançado da proteômica para detectar novos antígenos, inclusive proteínas secretadas por *L. infantum* que em estudos recentes, foram utilizadas como antígeno e realizaram a detecção de 100% dos

animais infectados (FARIA et al., 2015; PINEDO-CANCINO et al., 2016; TRAVI et al., 2018).

3.6 VACINAS

As espécies de *Leishmania* parasitam macrófagos e causam a infecção devido a suas habilidades de evasão e atenuação da função microbicida do hospedeiro. Essa função dá-se por meio de modulação das respostas imunológicas, inata e adaptativa. Portanto, é necessário a instigação de uma resposta imune forte para a prevenção e o tratamento da doença. Para inibir o crescimento dos parasitos, é essencial a indução de uma resposta mediada por linfócitos T *helper* do tipo 1 (Th1) para a ativação da explosão oxidativa incluindo a produção de óxido nítrico, gerando radicais altamente reativos, que podem matar microrganismos invasores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; JAIN; JAIN, 2015). Já é estabelecido que células CD4⁺T (Linfócitos T helper) assim como CD8⁺T (Linfócitos T citotóxicos) desempenham papel importante conferindo cura e defesa contra LV. A polarização da resposta imune é muito importante, pois a resposta Th1, caracterizada pela expressão de Interleucina 12 (IL-12), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α), protege o indivíduo da infecção. Enquanto a resposta Th2, caracterizada pela expressão de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e fator de transformação do crescimento – beta (TGF- β), dá suporte à persistência da infecção (BARBIERI, 2006; JAIN; JAIN, 2015).

Vacinas contra leishmaniose vêm sendo estudadas há muito tempo. Alguns estudos reportam moderado sucesso obtido nos anos 1930 e 1940. Porém, foi na década de 1980 que Mayrink e seus colaboradores conduziram uma série de experimentos no Brasil, em um dos quais obteve 53,3% de eficácia na resposta à vacinação medida por intradermoreação (ANTUNES et al., 1986; MODABBER, 2010). Essas vacinas, conhecidas como vacinas de primeira geração, são caracterizadas por utilizarem os antígenos vivos, atenuados ou mortos. Porém, apesar de terem apresentado bons resultados gerando proteção contra leishmaniose, em alguns casos elas apresentam dificuldades na sua padronização e otimização da formulação para induzir resposta imune efetiva isenta de respostas indesejadas (NOAZIN et al., 2008). Além de necessitarem do cuidado para que o patógeno não seja capaz de recuperar sua virulência (NAGIL; KAUR, 2011; SILVESTRE; CORDEIRO-DA-SILVA; OUAISSI, 2008). Por esses fatores, outro grupo de vacinas vem se destacando, as chamadas vacinas de segunda geração, formuladas com produtos mais refinados como proteínas recombinantes e peptídeos com

adjuvantes ou expressão em vetores heterólogos, que representam melhores opções para campanhas de vacinação (JAIN; JAIN, 2015). Sua natureza recombinante lhes confere maior acessibilidade em larga escala e abordagens com maior reprodutibilidade e melhor custo benefício (DUTHIE et al., 2012). Dentre as várias proteínas utilizadas como vacinas estão a glicoproteína 63 (gp63), proteína ligante de fucose e manose (FML), proteína Q quimera, proteinase cisteína (CP) e muitas outras (NAGIL; KAUR, 2011; EVANS; KEDZIERSKI, 2012; JAIN; JAIN, 2015).

A proteína recombinante p45 de *L. donovani* (rLDp45) foi descrita como capaz de induzir uma resposta imune Th1 substancialmente protetiva, confirmada pelo aumento na expressão de mRNA de IFN- γ , IL-12 e TNF- α com uma diminuição simultânea de IL-4 e TGF- β , para proteger hamsters em uma infecção experimental (GUPTA et al., 2012). Antígeno específico de *Leishmania* na forma amastigota A2, quando formulado em forma recombinante com saponina, alumen e IL-12 ou expressado em adenovírus atenuado foi efetivo como vacina em animais para a proteção contra leishmaniose (FERNANDES et al., 2012). Células dendríticas derivadas da medula óssea estimuladas com histonas H1 de *L. infantum* foram avaliadas como potenciais candidatas a vacina, visto que foram capazes de elucidar uma resposta imune Th1 contra leishmaniose (AGALLOU et al., 2012).

Vacinas utilizando peptídeos recombinantes tem sido o principal foco no registro de patentes relacionadas a vacinas contra a leishmaniose, por conta de suas vantagens como alta pureza e elevado rendimento e maior estabilidade (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016; THOMAZ-SOCCOL et al., 2017; De BRITO et al., 2018). Vários peptídeos de diversas proteínas vem sendo utilizados para a formulação de vacinas contra leishmaniose (De BRITO et al., 2018). Em estudo realizado por Costa et al. (2015), peptídeos obtidos por *phage display* foram testados como vacinas contra infecção experimental por *L. infantum* em camundongos Balb-C, utilizando saponina como adjuvante. Pôde se observar o aumento na produção de IFN- γ e IL-12 além de diminuição da carga parasitária nos animais imunizados com esses peptídeos (COSTA et al., 2015) Uma vacina baseada em três peptídeos derivados do terminal carboxila do antígeno de superfície de promastigota (PSA) de *L. amazonensis* foi testada em fase pré-clínica em cães, conferindo imunidade contra infecção experimental por *L. infantum*, aumentando a produção de óxido nítrico e a atividade anti-leishmania associada a produção de IFN- γ , além de aumentar a produção de anticorpos IgG específicos (PETITDIDIER et al., 2019).

A primeira vacina de 2ª geração definida contra leishmaniose é a LEISH-F1 + MPL-SE, composta de uma proteína de fusão recombinante, envolvendo proteínas de *L.*

major e *L. braziliensis* (LEISH-F1), junto com o adjuvante monofosforil lipídio e esqualeno em emulsão estável (MPL-SE) (REED et al., 2007). Esta vacina vem apresentando bons resultados tanto em testes em animais, como em testes em humanos contra LC e LV, além de apresentar potencial para ser utilizada como imunoterápico juntamente com o tratamento convencional de LC e LM (MODABBER, 2010; DUTHIE et al., 2012).

Atualmente, a Leishtec®, baseada em proteína recombinante de amastigotas (rA2) e saponina como adjuvante, é a única vacina comercialmente disponível para LVC no Brasil (TESTASICCA et al., 2014; BRASIL, 2020b). Em estudo prospectivo realizado por Fernandes et al. (2014), 92% dos cães imunizados com essa vacina permaneceram saudáveis pelo período de 11 meses de observação. Já em estudo de fase III realizado no interior de Minas Gerais foi observada uma eficiência de 80,8% dessa vacina e uma redução de 46,6% na transmissão do parasito para os flebotomíneos alimentados de cães vacinados (REGINA-SILVA et al., 2016). Porém, em um estudo realizado em uma região de alta incidência de LVC no Espírito Santo, apesar dessa vacina conferir a diminuição na incidência de novas infecções, ela não apresentou bons resultados na prevenção do desenvolvimento da doença nos cães vacinados que acabaram se infectando durante o período de dois anos em que o estudo foi realizado (GRIMALDI et al., 2017). Isso indica que ainda é necessária a otimização da eficiência dessa e de outras vacinas contra leishmanioses.

Além disso, existem ainda as vacinas de terceira geração, que são baseadas no DNA codificador de proteínas do parasito ou do vetor (JAIN; JAIN, 2015). Pereira et al. (2015) realizaram ensaios de imunização em hamsters utilizando DNA de proteínas ribossomais ácidas e histonas nucleossomais de *L. infantum*. Ambos os antígenos foram capazes de gerar imunogenicidade, sendo que o primeiro deles foi capaz de induzir certa proteção contra *L. infantum* (PEREIRA et al., 2015).

3.7 PHAGE DISPLAY

Phage Display é uma técnica biotecnológica na qual sequências de aminoácidos exógenos podem ser expressos no capsídeo de um bacteriófago, os quais são selecionados através da ligação com anticorpos. O princípio da técnica pode ser utilizado para selecionar sequências de aminoácidos (peptídeos) com potencial para serem aplicadas como moléculas antigênicas (GRAY; BROWN, 2013; MOURA; ALVARENGA; THOMAZ-SOCCOL, 2017). Essa tecnologia foi descrita por George P. Smith (1985), quando demonstrou a exibição de peptídeos exógenos no capsídeo de fagos filamentosos

pela fusão da sequência genética de codificação do aminoácido de interesse ao gene III do fago. A variedade de peptídeos que pode ser obtida através dessa técnica é utilizada para compor bibliotecas de fagos, que podem ser utilizadas em processos chamados de *biopanning* para seleção dos clones reagentes (WU et al., 2016). O grande potencial de bibliotecas de peptídeos de *phage display* está relacionado com a capacidade de identificar moléculas que mimetizam os epítomos de proteínas de interesse, que são denominados mimótopos (GRAY; BROWN, 2013). Esses mimótopos possuem algumas similaridades com os aminoácidos do epítomo original e sempre apresentam sequências descontínuas, porém eles podem produzir resposta de anticorpos idêntica ou altamente similar àquela provocada pelo epítomo nativo (AGHEBATI-MALEKI et al., 2016; MOURA; ALVARENGA; THOMAZ-SOCCOL, 2017). O desenvolvimento de novos antígenos para diagnóstico ou reagentes preventivos (imunoterápicos ou imunoproteção) pode ser realizado a partir da seleção de peptídeos de bibliotecas de *phage display* a fim de identificar mimótopos específicos para uma doença. A seleção dos fagos que expressam esses mimótopos é feita utilizando amostras como soro de pacientes infectados com a doença (FOLGORI et al., 1994; WU et al., 2016).

Independente do propósito da utilização dessa técnica, do formato utilizado e da estratégia de triagem, a seleção de moléculas por *biopanning* requer a utilização de alguns ciclos de seleção (BAZAN; CALKOSINSKI; GAMIAN, 2012). Esse processo consiste na incubação que permite a interação desses fagos com as moléculas alvo e a remoção dos fagos não específicos (MOURA; ALVARENGA; THOMAZ-SOCCOL, 2017). Após a eluição das partículas com afinidade aos alvos, ocorre a amplificação desses fagos, pela infecção de células hospedeiras, geralmente *Escherichia coli* com esses fagos. Após a amplificação, esses fagos são submetidos a novos ciclos de seleção, são realizados de três a cinco ciclos para selecionar os clones de fagos específicos (BAZAN; CALKOSINSKI; GAMIAN, 2012; GRAY; BROWN, 2013; MOURA; ALVARENGA; THOMAZ-SOCCOL, 2017). A utilização de mais de 5 ciclos pode favorecer a seleção de variantes de alta afinidade dentro da população viral, que acabam competindo com as de menor afinidade pelo sítio de ligação da molécula alvo, prejudicando a diversidade de clones avaliada no estudo (COELHO et al., 2015).

Essa metodologia de seleção foi utilizada para analisar 724 clones de fagos, dos quais 70 foram reconhecidos como reagentes para IgGs específicas contra *Mycobacterium leprae* e, ao final do processo sete sequências de peptídeos foram patenteadas para uso em diagnóstico e vacinas (ALBAN et al., 2013; ALBAN et al., 2014). Essa técnica de seleção de peptídeos também já foi utilizada junto a soros de pacientes

infectados com papiloma vírus humano (HPV), síndrome respiratória aguda grave (SARS) e gripe aviária (H5N1) entre outras (SANTAMARIA et al., 2001; LIU et al., 2004; KHURANA et al., 2009). Portanto, apresenta-se como uma excelente plataforma para busca de antígenos para diagnóstico ou como imunoterápicos.

Em estudos realizados por Toledo-Machado e colaboradores, foram utilizados soros de cães infectados naturalmente com *L. infantum* para selecionar 12 clones dentre 198 testados frente a IgGs anti-*L. infantum*. Esses clones foram testados frente a IgGs anti-*T. cruzi*, como uma seleção negativa a fim de eliminar as reações cruzadas. Ao total, três sequências foram sintetizadas e utilizadas em testes de diagnóstico para LVC, apresentando resultados de sensibilidade de 100% e especificidade acima de 97% (TOLEDO-MACHADO et al., 2015a). Adicionalmente, uma das sequências foi testada como vacina em experimentos de imunização que indicaram diminuição acima de 98% na carga parasitária do animais infectados experimentalmente em comparação aos resultados aos controles utilizando antígeno solúvel *L. infantum* e solução salina (TOLEDO-MACHADO et al., 2015b).

Rhaim e Houimel (2016) obtiveram seis sequências de peptídeos ligantes à forma promastigota de *L. major* obtidas a partir da técnica de *phage display*, visando a utilização terapêutica dessas moléculas. Um dos peptídeos obtidos foi capaz de inibir a cinética de crescimento de *L. major* em ensaios *in vitro* e reduzir o desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos Balb C infectados experimentalmente em testes *in vivo* apresentando uma taxa de proteção de 81,94% após 13 semanas desde a infecção.

Ramos et al. (2017) utilizou soros de pacientes humanos na técnica de phage display para selecionar peptídeos com potencial para serem utilizados como vacinas contra leishmaniose visceral. O estudo foi capaz de identificar dois peptídeos que nos ensaios de imunização geraram uma resposta Th1 que se manteve após o desafio dos animais testados, além conter significativamente a infecção dos animais por *L. infantum*.

Em estudo realizado por Link et al. (2017) foram obtidos três peptídeos através da técnica de phage-display, selecionados utilizando IgGs específicas anti-*L. braziliensis* obtidas a partir de soros de pacientes de LC. Esses peptídeos foram utilizados em ensaios de imunização em hamsters que, após esses experimentos, passaram a apresentar em seu soro anticorpos capazes de reconhecer proteínas de *L. braziliensis*. Esses peptídeos foram testados individualmente e em um mix como antígenos para diagnóstico através da intradermoreação de Montenegro (Teste imunológico utilizado para diagnóstico de LC) em modelo animal, utilizando *Cavia porcellus*. Os peptídeos apresentaram melhores resultados nos testes do que o antígeno padrão de Montenegro

indicando que estes podem ser utilizados como substitutos ao antígeno padrão utilizado (GUEDES et al., 2019).

3.8 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é a principal espécie reativa de nitrogênio produzida por macrófagos. A produção se dá pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Esta enzima é ausente em macrófagos não ativos, mas pode ser induzida em resposta a produtos microbianos que ativam receptores do tipo *Toll* (TLR), especialmente quando combinados ao IFN- γ . A iNOS catalisa a conversão de arginina a citrulina na presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenosina (NADPH), liberando o gás NO, de difusão livre. NO pode se combinar com peróxido de hidrogênio ou superóxido, produtos da peroxidase fagocitária, produzindo radicais de peróxinitritos, que são altamente reativos e causam a morte de microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A indução da produção de NO por IFN- γ e TNF- α já foi relatada como mediação no combate à infecção de macrófagos por *L. major*. Camundongos infectados com esse parasito apresentaram significativa redução no desenvolvimento das lesões, quando essas foram tratadas com a injeção de IFN- γ e TNF- α recombinantes, enquanto que a ação terapêutica dessas citocinas era completamente inibida por um inibidor específico da síntese de óxido nítrico (LIEW; LI; MILLOTT, 1990).

A produção de NO mediada por iNOS desempenha um papel fundamental no combate a infecções de parasitos intracelulares, como *Leishmania spp.*, prevenindo sua proliferação (ASCENZI; BOCEDI; GRADONI, 2003). A inibição da produção de NO, ou o rompimento dos genes de iNOS faz com que os macrófagos percam a capacidade de controle dos parasitos. Ratos resistentes a infecção por *Leishmania spp.* apresentaram perda dessa resistência à infecção quando tratados com inibidores de NO (WEI et al., 1995).

Um dos mecanismos de evasão do sistema imune por parte do parasito é a inibição da produção de NO pela ativação da proteína tirosina fosfatase SHP-1 e a sua subsequente reação com moléculas envolvidas na produção de NO (SHIO et al., 2012). Por esta razão a dosagem da produção de óxido nítrico vem sendo empregada na avaliação de antígenos candidatos vacinais ou a novas drogas contra leishmanioses (NOLETO et al., 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada no presente estudo consiste na obtenção das imunoglobulinas específicas anti-*L. amazonensis*, que, por sua vez, são utilizadas para realizar os ciclos de seleção dos fagos que expressam mimótopos de proteínas de *Leishmania* spp. Os fagos selecionados têm seu DNA sequenciado e traduzido nos peptídeos, que foram sintetizados quimicamente e então avaliados *in silico* (para indução de IFN- γ e IL-4) e *in vitro* (para a indução da produção de óxido nítrico e sorodiagnóstico da LVC). Para melhor entendimento as principais etapas desenvolvidas no presente estudo estão descritas na FIGURA 8.

FIGURA 8 - PRINCIPAIS ETAPAS PARA A SELEÇÃO E TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PEPTÍDEOS MIMOTOPOS.



FONTE: O autor (2020).

4.1 PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS DE *Leishmania amazonensis*

Para realizar o teste ELISA e os ensaios de *Western blotting*, foram produzidos antígenos a partir de culturas de promastigotas da cepa de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) conforme metodologia descrita por Castro, Thomaz-Soccol e Agur (2003). Essa cepa foi previamente caracterizada por isoenzimas e armazenada no

criobanco da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (DEBB) (THOMAZ-SOCCOL, 1993). Os parasitos foram cultivados em meio Neal, Novy, Nicolle (NNN) bifásico, usando solução salina estéril a 0,9% como fase líquida e incubação a 24°C em estufa BOD. A cada cinco dias, as cepas eram repicadas para novos tubos contendo meio de cultura. Após a obtenção de oito tubos ricos em promastigotas, 0,5 mL do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para frascos de cultura de 100 mL contendo 15 mL de meio de cultivo RPMI estéril (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Rockville, Maryland, USA). Seguindo a multiplicação do parasito, as promastigotas foram recuperadas por filtração com gaze esterilizada, seguida de centrifugação a 3.500 g por 10 min a 4°C. Foram realizadas três lavagens com solução salina nas concentrações 0,9; 0,3; 0,9% e uma lavagem com tampão fosfato (PBS 1X – [NaCl]: 137 mM; [KCl]: 2,7 mM; [Na₂HPO₄]: 10 mM; [KH₂PO₄]: 1,8 mM), pH 7,2, para eliminar qualquer remanescente de meio de cultura, lisar os eritrócitos e remover a hemoglobina de coelho. Após a última centrifugação, o *pellet* contendo os parasitos foi ressuspenso em água destilada esterilizada em um volume igual a metade do volume do sedimento. Para o processo de rompimento dos protozoários, primeiramente foram realizados seis ciclos de congelamento rápido em nitrogênio líquido e descongelamento por imersão em banho maria a 37°C. Em seguida, os antígenos foram mantidos em banho de gelo enquanto eram submetidos a ruptura por ultrassom (Sonoplus HD 2070, Bandelin, Berlin, Germany) a 150 W por seis séries de 30 segundos e intervalos de 1 minuto. O produto resultante foi centrifugado a 14.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e filtrado em um sistema de esterilização (membrana de 0,22 µm), constituindo o antígeno solúvel (AS) de *L. amazonensis*. A dosagem de proteínas do AS foi realizada utilizando o método de Lowry (1951). O conteúdo produzido foi subdividido em alíquotas, as quais foram armazenadas em tubos criogênicos a -20°C para uso nos experimentos subsequentes.

4.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *L. amazonensis*

A análise do perfil eletroforético do AS de *L. amazonensis* foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Para isso, 20 µg do antígeno do parasito foram diluídos quatro vezes em tampão de amostra, na presença de beta-mercaptoetanol como agente redutor, e aquecido a

100°C por 5 min. Essa solução foi aplicada nos poços do gel de poliacrilamida 15% juntamente com o marcador de massa de 200 kDa. A corrida eletroforética ocorreu a 100 V em tampão de corrida composto de Tris (0,025 M), glicina (0,2 M) e SDS 0,5%, pH 8,3.

Após a eletroforese, foi realizada a coloração com nitrato de prata. O gel foi lavado com água destilada por 5 min, fixado com metanol 50% por 20 min e lavado com água destilada por mais 10 min. Em seguida, o gel foi fixado com glutaraldeído 10% por 30 min, e então lavado quatro vezes com água destilada por 10 min. As proteínas foram coradas com solução de nitrato de prata 1% (m/v), hidróxido de sódio 0,19% e hidróxido de amônio 3,5% (V/V). O gel foi corado por 20 min ao abrigo da luz e lavado duas vezes com água destilada por 5 min. Para a revelação da coloração do gel, o mesmo foi incubado em solução contendo ácido acético 0,025% e formaldeído 0,037% até a observação das bandas. A reação foi interrompida adicionando-se a solução de parada, composta por ácido acético 1% durante 20 min.

4.3 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM *Leishmania amazonensis*

A infecção experimental dos camundongos foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPR descrita no protocolo nº 26/2012. Para a infecção experimental dos animais foi utilizada a cepa *L. amazonensis* MHOM/BR/73/M2269, obtida junto ao departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR. A cultura foi realizada em meio 199 em estufa a 24°C por sete dias. Para recuperação dos parasitos o conteúdo da garrafa foi transferido para tubos falcon de 50 mL seguido de centrifugação a 3500 g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 30 mL de salina (0,9%) ao precipitado. Após a solubilização, o material foi centrifugado a 1500 g, por 10 min, a 4°C e desprezando-se o sobrenadante ao final. Em seguida, o material foi ressuscitado em 1 mL de salina (0,9%) e realizada a contagem em microscópio ótico, em aumento de 400X.

Para a etapa de infecção, foram formados dois grupos de animais (controle negativo e animais infectados), cada grupo contendo 10 animais. Primeiramente os animais foram identificados, pesados e divididos em caixas com cinco animais cada (duas caixas para cada grupo). Após foi realizada a assepsia da orelha esquerda e pata esquerda e foram inoculados 100 µL da suspensão de parasitos (10^7 promastigotas no total) ou salina (controle negativo) nos animais e em seguida foi pressionado o local da inoculação por alguns segundos. Os animais foram monitorados semanalmente avaliando-se o tamanho das lesões durante 90 dias. Durante esse período foi realizada a

coleta do soro dos animais a cada 15 dias. Após os experimentos, os animais foram eutanasiados seguindo as recomendações CEUA.

4.4 SELEÇÃO DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM ANIMAIS INFECTADOS.

Os soros dos animais infectados e controles negativos foram testados pelo método ELISA para selecionar as amostras contendo anticorpos anti-*L. amazonensis*. Para realizar este ensaio, foram utilizados anticorpos específicos anti-imunoglobulina G (IgG) de Balb C conjugados com peroxidase na região Fragmento Cristalizável (Fc) (código A0168 - Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) e cromógeno OPD (o-Phenylenediamine, código P6787, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) em placas de polipropileno com 96 poços (Costar, Cambridge, MA, USA).

Os testes foram conduzidos em triplicata, nas microplacas de 96 poços, onde cada poço foi revestido com 100 µL do AS, preparado previamente conforme o item 4.1, (500 ng/poço) em tampão de ligação (Na_2CO_3 0,16%, NaHCO_3 0,29% e pH 9,6) e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Seguindo essa etapa, a solução com o antígeno foi descartada e as placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (NaCl 0,9% e Tween 20 (0,05%) para remover o antígeno não ligado. O bloqueio dos espaços não ocupados pelo antígeno foi realizado adicionando-se 120 µL de solução de bloqueio (caseína 2% em tampão PBS 1X, pH 7,4) em cada poço e incubando as placas por 1 h a 37°C.

Após a incubação, as placas foram novamente lavadas duas vezes. Um total de 100 µL dos soros dos animais infectados experimentalmente, diluídos (1:100) em tampão de incubação (caseína 0,25% e Tween 20 0,05% em tampão PBS 1X pH 7,4) foram adicionados aos poços das placas, e as mesmas foram incubadas por 1 h a 37°C. Após realizar a lavagem das placas (4x), adicionou-se a cada poço 100 µL de anticorpo anti IgG de Balb C conjugado a peroxidase, diluído (1:10.000) em tampão de incubação incubando-as a 37°C por 1h. As placas foram lavadas novamente quatro vezes, e em seguida adicionou-se 100 µL do cromógeno OPD (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA). Após incubação por 15 min ao abrigo da luz, a reação foi interrompida adicionando-se 20 µL de solução de ácido sulfúrico 5%. A absorbância da reação foi detectada a 492 nm com o auxílio de um espectrofotômetro.

4.5 PRECIPITAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-*LEISHMANIA* COM SULFATO DE AMÔNIO

Para realizar a purificação das IgGs anti-*L. amazonensis* dos soros colhidos dos animais positivos, um *pool* de soros foi formado (500 µL de cada animal) e utilizado. Esse conteúdo foi centrifugado por 30 min, a 3.000 g, a 4°C. As imunoglobulinas obtidas do sobrenadante foram precipitadas pela adição lenta de uma quantidade igual de solução saturada de sulfato de amônio, enquanto era resfriada em banho de gelo sob agitação branda, centrifugando-se então por 30 min, a 3.000 g e 4°C, como descrito por Harlow e Lane (1988). O sobrenadante foi descartado e as imunoglobulinas presentes no precipitado foram reconstituídas em tampão PBS 1X, pH 7,4, e dialisadas na mesma solução para remover o sulfato de amônio (uma diálise *overnight* a 4°C e outra por 2 h a temperatura ambiente).

4.6 SDS-PAGE PARA AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS APÓS PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

A pureza e a massa molecular das imunoglobulinas, obtidas por precipitação do *pool* de soros por sulfato de amônio (item 4.5), foram avaliadas por SDS-PAGE como descrito previamente (item 4.2), com algumas modificações descritas a seguir. A eletroforese foi realizada usando um gel de poliacrilamida a 10% e as amostras foram preparadas sob condições redutoras e não redutoras. Três microgramas de proteína foram aplicados em cada poço do gel.

Após a conclusão da corrida eletroforética, os géis foram lavados com água destilada e corados com solução de Azul de Coomassie por 1h sob agitação branda em agitador orbital (80 rpm), e então descorados em solução descolorante, sob agitação (80 rpm) a temperatura ambiente. Ao final foi analisada a formação de bandas em comparação com o marcador de massa molecular de 200 kDa.

4.7 OBTENÇÃO DA SUBCLASSE DE IMUNOGLOBULINAS G

Para realizar as etapas de seleção do procedimento de *biopanning*, as IgG anti-*L. amazonensis* de animais infectados foram obtidas por um processo de purificação de dois estágios. Primeiramente as IgGs foram purificadas por cromatografia de afinidade em agarose de proteína G, conforme a metodologia descrita por Harlow e Lane (1988),

seguida de purificação usando antígenos transferidos para uma membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno - Millipore Corporation, Billerica, MD, USA).

A fração do total de imunoglobulinas foi aplicada à coluna de proteína G-agarose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. A coluna foi lavada com a mesma solução usada para equilibrá-la, até que nenhuma proteína fosse detectada no método de Bradford (1976). As IgGs foram eluídas com tampão de glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,7, coletadas e neutralizadas com tampão Tris-HCl 1M, pH 9,0. As frações contendo as IgGs obtidas foram dialisadas com tampão PBS pH 7,4. A pureza e a massa molecular da solução de imunoglobulinas foram avaliadas por SDS-PAGE.

4.8 OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS G ANTI- *L. amazonensis*

Para obter IgGs anti-*L. amazonensis*, os ASs de *L. amazonensis* foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidos para uma membrana de PVDF em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%) *overnight* a 24 V, seguido por 1 h a 48 V. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com Tween 20 (0,3%) em tampão PBS 1X pH 7,4 por 1 h sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com tampão PBS-Tween 0,05% (PBST-0,05%) cinco vezes por 3 min e incubada com as IgGs totais, obtidas previamente (item 4.7), diluídas em tampão PBST-0,05%. Após 2 h de incubação, a membrana foi lavada com tampão PBST-0,05% cinco vezes por 5 min e os anticorpos foram eluídos pela adição de tampão glicina 0,1 M e NaCl 0,15 M pH 2,7, por 30 min sob agitação. A solução de anticorpos eluídos foi recuperada, neutralizada com Tris-HCl 1 M pH 9,0, e a concentração proteica foi avaliada pelo método de Bradford.

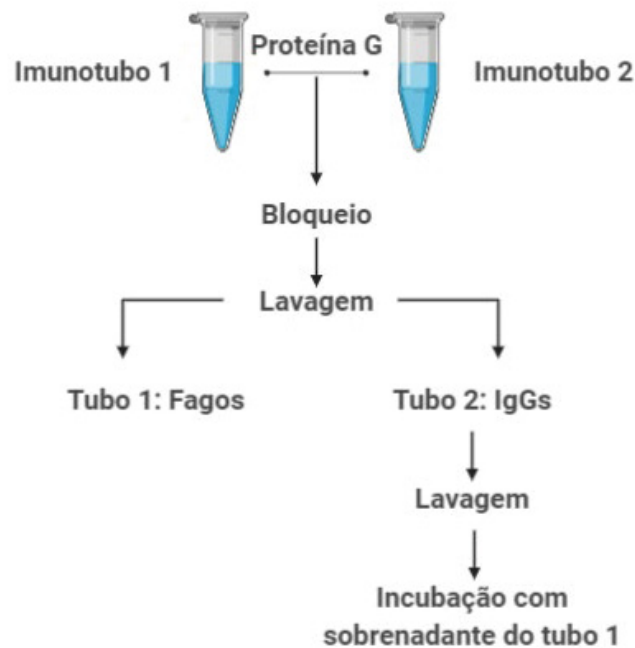
A avaliação da reatividade das IgGs anti-*L. amazonensis* foi realizada por Western blot. A eletroforese foi realizada com 40 µg do AS obtido anteriormente (item 4.1.) em gel de poliacrilamida 15%. Após a corrida eletroforética, as proteínas do AS foram transferidas para uma membrana de PVDF. A transferência, o bloqueio e as lavagens da membrana ocorreram conforme descrito anteriormente. A membrana foi incubada com as IgGs anti-*L. amazonensis* purificadas (40 µg/mL em tampão PBS 1X pH 7,4) e utilizando o soro total dos animais infectados experimentalmente (diluição 1:50) por 2 h, e então submetida a uma lavagem com PBST-0,05%. A detecção foi realizada por 1 h a temperatura ambiente utilizando anti-IgG de Balb-C (específico à porção Fc) conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluído 1:5000 em tampão PBST

– 0,05%. Após nova lavagem, a revelação foi realizada com solução de 1 mg de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) em 1,5 mL de Tris 50 mM, NaCl 0,15 M pH 7,6, e 1,2 µL de H₂O₂ 30%. A reação foi mantida até ser observado a visualização das bandas, e então interrompida por lavagem com tampão PBS pH 7,4.

4.9 PHAGE DISPLAY: EXPRESSÃO DE PEPTÍDEO EM SUPERFÍCIE DE FAGO

Após a obtenção dos anticorpos IgGs anti-*L. amazonensis* (ligantes IgG para AS de *L. amazonensis* imobilizados em membrana após western blot) oriundos dos soros dos animais infectados, a técnica de *phage display* foi realizada como descrito por Villard et al. (2003), com as seguintes modificações. Inicialmente, dois imunotubos (Nunc, Roskilde, Denmark) foram revestidos com 10 µg de proteína G (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) diluída em solução salina Tris tamponada (TBS; Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e incubados sob agitação *overnight* a 4°C. Subsequentemente, os imunotubos foram lavados duas vezes com tampão de lavagem (TBS-T 0,05%), bloqueados com Albumina de Soro Bovino (BSA) 3% em TBS-T 0,05% por 1 h a 37°C e lavados novamente. Cada um dos imunotubos foi submetido a um passo distinto na técnica de *phage display* (FIGURA 9). No Imunotubo 1, 5×10^{12} fagos de quatro bibliotecas de peptídeos diferentes (LX4, LX8, X8CX8, X15), obtidos junto ao Dr. J. Scott (Simon Fraser University, Canada), foram adicionados, e incubados *overnight* a 4°C. No Imunotubo 2, 5 µg de IgGs específicas diluídas em TBS foram adicionadas e incubadas *overnight* a 4°C. Após o período de incubação, o sobrenadante do Imunotubo 2 foi descartado e o sobrenadante do Imunotubo 1 foi adicionado ao Imunotubo 2, que então foi incubado *overnight* por 4°C. Quatro *pannings* foram realizados; para a primeira etapa, anticorpos específicos anti-*L. amazonensis* foram utilizados na concentração de 5 µg/mL, enquanto que para a segunda, terceira e quarta etapas foram utilizados, respectivamente, 2,5, 1,5 e 1 µg/mL.

FIGURA 9 - ETAPA INICIAL DA TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY.



FONTE: Adaptado de LINK, 2017.

O sobrenadante do remanescente no imunotubo (tubo 2) foi descartado e o imunotubo foi lavado com TBST-0,05% para remover qualquer fago que não tenha se ligado. Subsequentemente, os fagos ligados foram eluídos com solução de glicina (0,1 M, pH 2,2) e BSA 1 mg/mL. O eluato foi transferido para um microtubo e imediatamente neutralizado com Tris-HCl (2 M, pH 9,0).

Para amplificar os fagos, o eluato contendo os fagos foi adicionado a 10 mL de uma cultura em crescimento exponencial de *Escherichia coli* células K91 (absorbância a 550 nm = 1,9) em meio Luria-Bertani (LB). O conteúdo foi incubado por 10 min a 37°C e, em seguida, adicionado a 100 mL de meio LB contendo 0,2 µg/mL de tetraciclina. Após 30 min de indução a 225 rpm, a concentração de tetraciclina foi ajustada para 20 µg/mL. O crescimento bacteriano ocorreu *overnight* a 37°C sob agitação a 225 rpm.

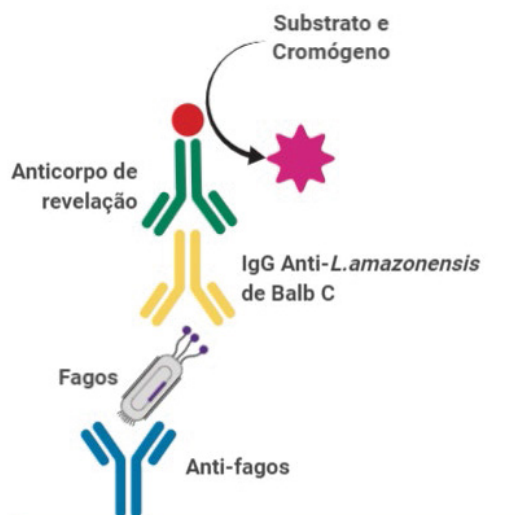
A cultura bacteriana foi centrifugada por 20 min, a 5.000 g e 4°C, e os fagos foram purificados do sobrenadante por precipitação em solução de 20% de polietileno glicol 8000 (PEG 8000) em NaCl 2,5 M. A suspensão foi centrifugada por 40 min, a 12.000 g e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em tampão TBS. Subsequentemente, a solução foi transferida para microtubos e centrifugada a 14.500 g, por 15 min a 4°C, para remover os potenciais detritos celulares. Os fagos obtidos foram utilizados nos próximos ciclos de seleção ou armazenados a -20°C. Nas etapas restantes,

2×10^{11} fagos amplificados do ciclo anterior foram incubados com IgG anti-*L. amazonensis*.

4.10 REATIVIDADE DOS CONJUNTOS DE FAGOS A CADA ETAPA DE SELEÇÃO POR TESTE ELISA

Após o ciclo final de seleção, a reatividade dos conjuntos de fagos de cada uma das quatro etapas de seleção, foi avaliada pela técnica ELISA sanduíche, como descrito por Link et al. (2017), utilizando as IgGs específicas anti-*L. amazonensis* obtidas pela metodologia descrita no item 4.8 (FIGURA 10). Uma placa de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, USA) foi revestida com 0,5 µg/mL de anticorpos anti-fagos (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) em 100 mM de NaHCO₃ (pH 8,6) e incubada *overnight* a 4°C. Os poços foram lavados duas vezes com solução de lavagem (0,9% de NaCl e 0,05% de Tween 20). O bloqueio dos sítios livres foi realizado usando uma solução de caseína 2% em PBS pH 7,4 por 1 h a 37°C. Cada poço recebeu 10⁹ fagos diluídos em tampão de incubação. A placa foi incubada por 1 h a 37°C, lavada quatro vezes e incubada por 1h a 37°C com IgGs anti-*L. amazonensis* (10 µg/poço). A detecção da reação foi realizada como descrito no item 4.4.

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TESTE ELISA PARA AVALIAR A IMUNOREATIVIDADE DOS CICLOS DE SELEÇÃO.

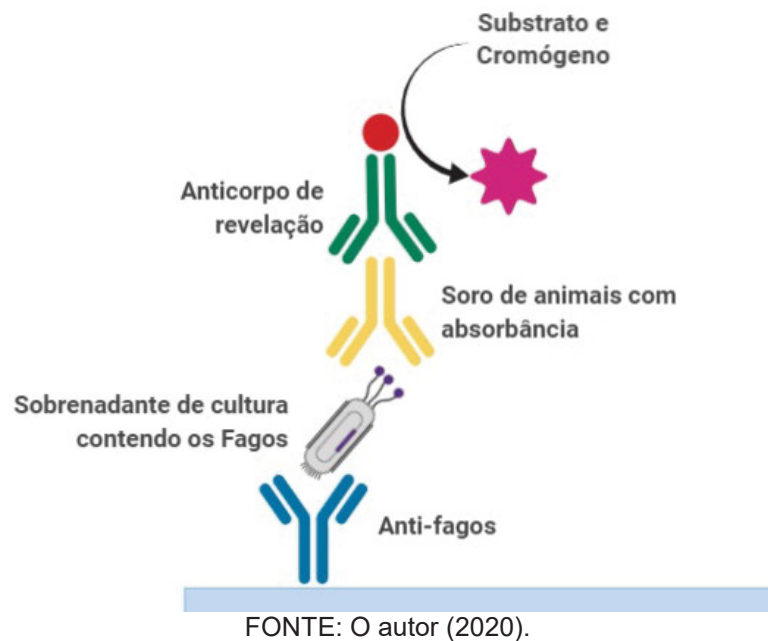


FONTE: O autor (2020).

4.11 TRIAGEM DOS CLONES DE FAGOS

Para identificar os clones dos fagos capazes de ligar com anticorpos de animais infectados com *L. amazonensis*, colônias do ciclo de seleção mais imunorreativo foram coletadas aleatoriamente e cultivadas *overnight* a 37°C em placas de cultura de 96 poços de poliestireno (BIOFIL®) em meio LB contendo 20 µg/mL de tetraciclina. As placas foram centrifugadas por 20 min, a 1.600 g e 4°C, e o sobrenadante da placa de cultivo contendo os fagos foi utilizado diretamente no teste ELISA sanduíche, como descrito no item 4.10. Cada clone de fago foi testado com soros de animais positivos para a infecção experimental, com as seguintes modificações: em cada poço, 50 µL do sobrenadante da cultura de cada fago foi adicionado a 50 µL de tampão de bloqueio. Os clones foram selecionados usando o *pool* de soro de alta absorvância (obtidos a partir das coletas de soro dos dias 75 e 90 após a infecção) testado por ELISA com AS de *L. amazonensis*. O *pool* de soros foi utilizado na diluição 1:100. Como controle negativo, foi utilizado o sobrenadante da cultura de *E. coli* K91 (FIGURA 11).

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TESTE ELISA PARA SELEÇÃO DOS FAGOS.



4.12 OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS PEPTÍDEOS

Os clones mais reativos (com absorvância pelo menos duas vezes maior que o controle negativo) foram selecionados para sequenciamento do DNA e subsequente identificação da sequência de aminoácidos. Para isso, os clones de fagos amplificados em *E. coli* foram submetidos a extração do DNA usando o QIAprep Spin M13 Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. A sequência dos peptídeos dos

clones dos fagos foi determinada pelo método BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Caloformia, USA) usando o primer reverso 5'-GCT GCA TCT TTT AGC AGC-3'. As sequências dos peptídeos obtidas foram analisadas por sua similaridade a outras sequências já registradas na plataforma GenBank.

4.13 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

A síntese de peptídeos foi realizada de acordo com o protocolo padrão (MERRIFIELD, 1969) utilizando cloroformiato de 9-fluorenilmetila (Fmoc) como fase sólida química com um sintetizador peptídico automatizado ResPep SL (Intavis Bioanalytical Instruments, Nattermannallee, Germany) segundo Alban (2011). A massa dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massa utilizando um instrumento de MALDI-TOF/TOF Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e software FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

4.14 ANÁLISE *IN SILICO* DOS PEPTÍDEOS MIMOTOPOS OBTIDOS

Os peptídeos obtidos por síntese química tiveram suas sequências avaliadas por testes *in silico* utilizando duas ferramentas diferentes. Ambas as ferramentas foram desenvolvidas por Dhanda et al. (2013a; 2013b). A primeira foi usada para avaliar o potencial de cada peptídeo na indução de IFN- γ (IFNepitope). O software utilizado parte de um banco de dados do Immune Epitope Database (IEDB), no qual os ligantes de MHC de classe II testados para indução de IFN- γ são classificados em indutores e não indutores. Baseando-se nessa classificação, essa ferramenta realiza uma predição de quais peptídeos da biblioteca submetida à análise são indutores de IFN- γ , levando em conta a composição de aminoácidos e o comprimento das sequências.

A segunda ferramenta foi usada para avaliar o potencial de cada peptídeo na indução de IL-4 (usando o software IL4Pred). Semelhante à metodologia para a predição de epítomos indutores de IFN- γ , o software utilizado para a predição de epítomos indutores de IL-4 também parte de um banco de dados do IEDB, com sequências de 8 a 15 aminoácidos classificadas em positivas ou negativas para indução de IL-4. São analisadas a composição de aminoácidos, de dipeptídeos e propriedades físico-químicas, para realizar a predição de quais dos epítomos apresentam potencial para a indução de IL-4.

A análise das sequências de peptídeos, tanto para o potencial indutor de IFN- γ como o potencial indutor de IL-4, foi realizada utilizando a ferramenta Support Vector Machine (SVM) para uma abordagem de *Machine Learning*.

4.15 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A indução da produção de óxido nítrico foi medida pela dosagem de nitrito, que é um produto mais estável da degradação por oxidação do óxido nítrico. A dosagem de nitrito foi realizada segundo metodologia proposta por Green et al. (1982). Esse método de análise relaciona a concentração de NO_2^- com a absorvância a 550 nm.

Para realização da dosagem de espécies reativas de oxigênio, foram plaqueados 100 μL de uma suspensão de macrófagos (linhagem Raw 264.7) na concentração de 10^6 células/mL, em meio RPMI suplementado com L-glutamina 2 mM, glucose 4,5 g/L, bicarbonato de sódio 2 g/L, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il]etanosulfônico (HEPES) 6,25 mM, soro fetal bovino (SFB) 10 %, estreptavidina 50 $\mu\text{g/mL}$ e penicilina 100 U/mL em placas de 24 poços (BIOFIL®) e incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 por 30 min.

Após o período de adesão dos macrófagos à placa, 25 μg de cada peptídeo, diluídos em 300 μL de meio RPMI suplementado, foram adicionados individualmente. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada peptídeo. Como controle positivo da reação, foi utilizado lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) na concentração de 100 ng/mL. O controle negativo consistiu apenas dos macrófagos sem nenhum tratamento. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 durante intervalos de 48 e 72 h.

Ao final de cada intervalo, o sobrenadante de cada poço foi coletado e misturado em placas de 96 poços na proporção 1:1 com o reagente de Griess, que consiste na mistura de volumes iguais de duas soluções (A e B). A solução A é formada por naftiletilenodiamino 0,1% (m/v) diluído em ácido orto-fosfórico 0,5%. A solução B é formada por sulfonamina p-aminobenzeno 1% (m/v) diluído em ácido orto-fosfórico 0,5%. A reação ocorreu por 10 min, e então foi realizada a leitura da absorvância a 550 nm em leitor de placa.

A fim de relacionar as medidas de absorvância com a concentração de nitrito no sobrenadante do meio de cultivo, foi realizada uma curva de calibração, utilizando nitrito de sódio como padrão. A curva foi feita variando concentrações de 0 a 100 μM de nitrito

de sódio. A reação com o reagente de Griess, e a leitura se deram como descrito anteriormente.

A análise estatística da produção de NO foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett, utilizando o GraphPad Prism version 8.2.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

4.16 TESTE IMUNOENSAIO (ELISA)

Os peptídeos foram submetidos como antígenos em testes de ensaio imunoenzimático (ELISA) contra *pool* de soros de animais positivos e negativos para LVC. Para a realização destes testes, foram classificados como positivos, soros de animais que apresentavam resultados positivos para testes de cultura do parasito, teste imunocromatográfico e ELISA utilizando a proteína recombinante LbK39 estudada por nosso grupo de pesquisa (De SOUZA et al., 2019). Os soros dos animais negativos foram obtidos junto ao centro de controle de zoonoses (CCZ) de uma região não endêmica para LVC. A coleta dos soros dos cães sua utilização nesta etapa foi aprovada pelo CEUA da UFPR (protocolo nº 44/2014).

Inicialmente, os testes foram feitos utilizando os peptídeos na concentração de 62,5 ng/poço. Os soros positivos e negativos foram utilizados como *pools* de três amostras, cada um na diluição de 1:100. Os testes foram realizados como descrito no item 4.4, utilizando antígeno solúvel de *L. infantum* na concentração de 1 µg/poço (produzido pelo Laboratório de Biologia Molecular do DEBB na UFPR MHOM/FR/71/LEM75) como controle. A detecção foi feita com anticorpos anti-IgG canina conjugado a peroxidase na região Fc (código SAB3700109 - Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) e OPD como cromógeno.

Posteriormente, foram selecionados os peptídeos que apresentaram os melhores resultados no teste anterior e então, foi realizada a padronização destes peptídeos para o teste ELISA frente a soros de animais positivos e negativos para LVC. A padronização foi feita a partir de um planejamento experimental variando a concentração de peptídeos em cada poço (de 6,25 ng/poço a 100 ng/poço), a diluição de soro (de 1:100 a 1:400), e a diluição do anticorpo secundário anti-IgG canina (de 1:2500 a 1:7500). A análise estatística da padronização foi realizada utilizando o Minitab® Statistical Software, para identificar as melhores condições de uso dos peptídeos.

Os resultados obtidos na padronização de antígeno, soro e conjugado foram utilizados para avaliar a sensibilidade e a especificidade de cada peptídeo padronizado,

testando-os frente a soros de 50 animais positivos e 50 animais negativos para LVC. As medidas das absorbâncias foram analisadas pelo MedCalc Statistical Software versão 16.4.3 (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2016).

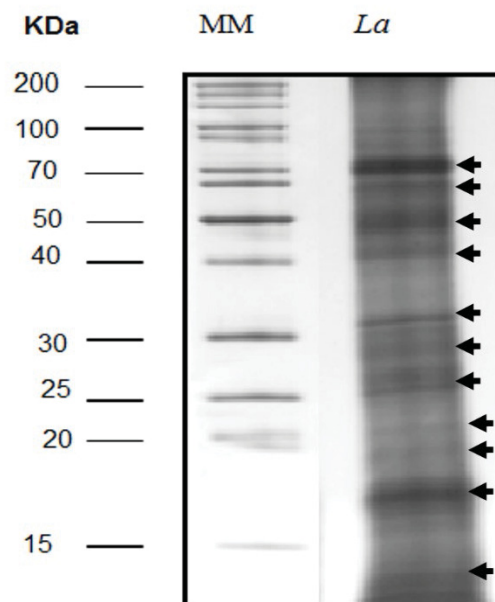
5 RESULTADOS

5.1 ANTÍGENOS

O método de dosagem de proteínas (LOWRY, 1951) determinou a concentração de 3,38 mg/mL de antígeno de *L. amazonensis*. As proteínas foram aliquotadas e armazenadas (-80°C) para os experimentos subsequentes.

O perfil eletroforético do AS de *L. amazonensis* foi obtido em um gel de poliacrilamida 15% sob condições redutoras corado com nitrato de prata (FIGURA 12). O extrato do antígeno apresentou bandas entre 15 e 100 kDa.

FIGURA 12 - SDS-PAGE DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *L. amazonensis*.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Colunas: 1- Padrão de massa molecular; 2- *L. amazonensis*. Vinte microgramas de proteína foram aplicados em cada canaleta do gel de poliacrilamida a 15% corado por nitrato de prata.

5.2 INFECÇÃO DOS ANIMAIS COM *Leishmania amazonensis*

Todos os camundongos Balb C infectados com *L. amazonensis* mostraram lesões ulceradas (FIGURA 13 A) ou nodulares (FIGURA 13 B) após 90 dias da infecção experimental. Os soros dos animais foram coletados com intervalos de 15 dias (seis coletas ao todo) e ao término do experimento, os animais foram anestesiados e eutanasiados.

FIGURA 13 - CAMUNDONGOS BALB C APRESENTANDO LESÕES CARACTERÍSTICAS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL.



FONTE: O autor (2020).

5.3 IMUNOGLOBULINAS G PURIFICADAS DE ANIMAIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Os soros dos animais não infectados foram avaliados por ELISA e apresentaram absorbância, em um comprimento de onda de 492 nm, variando de 0,051 a 0,064. O valor do *cutoff* foi estabelecido pela média aritmética acrescida de três vezes o desvio padrão, sendo igual a 0,063. A TABELA 1, a seguir, apresenta as médias das absorbâncias dos soros dos animais infectados obtidas a cada coleta.

TABELA 1 - MÉDIA DAS ABSORBÂNCIAS DOS SOROS DOS ANIMAIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE A CADA COLETA.

Dias após a infecção	Absorbância a 492 nm	
	Infectados	Controle negativo
15	0,0877	0,0530
30	0,0997	0,0530
45	0,1690	0,0570
60	0,2830	0,0530
75	0,3443	0,0550
90	0,4230	0,0530

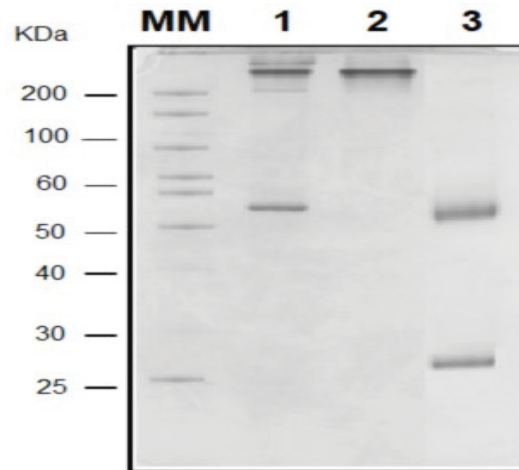
FONTE: O autor (2020).

Os soros dos animais infectados coletados nos intervalos de 75 dias após a infecção e 90 dias (por apresentar as maiores médias de absorbâncias) após a infecção foram utilizados para formar um *pool* de aproximadamente 10 mL para realizar a precipitação das imunoglobulinas e purificação da IgGs.

Tanto a obtenção das imunoglobulinas totais por precipitação por sulfato de amônio, quanto a subsequente obtenção das IgGs por cromatografia de afinidade a proteína G foram avaliadas em um gel de SDS e o resultado pode ser observado na FIGURA 14. A eletroforese em SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras,

utilizando marcador de massa de 200 kDa (MM), mostraram a presença de uma banda de albumina no precipitado total de imunoglobulinas do soro (faixa 1). Albumina possui um peso molecular de aproximadamente 60 kDa. Já na faixa 2 (IgGs purificadas por cromatografia de afinidade a proteína G), observa-se ausência dessa molécula, indicando o sucesso da etapa de cromatografia de afinidade para a obtenção da subclasse de imunoglobulinas G purificada. A faixa 3 apresenta as IgGs purificadas em condições redutoras, que acabam causando a desnaturação das imunoglobulinas separando a cadeia leve da cadeia pesada, como pode se observar a presença de duas bandas na coluna.

FIGURA 14 - SDS-PAGE DO TOTAL DE IgGS DE CAMUNDONGOS BALB C INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *L. amazonensis* E PURIFICADOS POR SULFATO DE AMÔNIO E CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE.



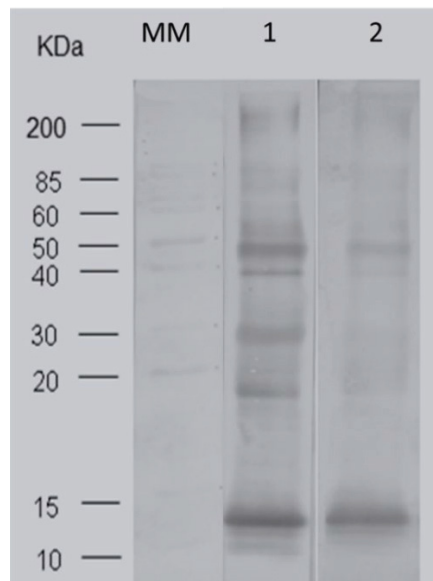
FONTE: O autor (2020).

NOTA: Colunas: MM, padrão de massa molecular; 1, IgGs totais precipitadas por sulfato de amônio em condições não redutoras; 2 IgGs totais purificadas por cromatografia de afinidade em condições não redutoras; 3, IgGs totais purificadas por cromatografia de afinidade em condições redutoras. Três microgramas de proteína foram aplicados em cada poço do gel de poliácridamida 10% corado com Azul de Coomassie.

5.4 IMUNOGLOBULINAS G ANTI-*Leishmania amazonensis*

Na seleção das IgGs específicas anti-*L. amazonensis* avaliadas pela técnica de western blot (FIGURA 15) foi observada reatividade tanto dos soros dos animais infectados (coluna 1) quanto das IgGs específicas obtidas no item 4.8 contra as proteínas do AS de *L. amazonensis*.

FIGURA 15 - REATIVIDADE DAS IgGs ANTI-*L. amazonensis* DE BALB C INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CONTRA ANTÍGENO DE *L. amazonensis*.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: Marcador de peso molecular (coluna MM). Soro de animais positivos diluição 1:50 (coluna 1) e 40 µg/mL de IgGs específicas anti-*L. amazonensis* (coluna 2) obtidas a partir de Balb-C infectados experimentalmente reagindo com as proteínas do AS de *L. amazonensis* transferidas para a membrana.

5.5 PHAGE DISPLAY

O número de fagos eluídos foi sempre menor que a quantidade incubada, visto que os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados no tubo se ligam a esses anticorpos pela interação específica dessas moléculas (TABELA 2). Um aumento na quantidade de fagos obtidos após cada ciclo pode ser observado, o que representa um aumento na quantidade total de fagos específicos. Esses resultados indicaram que seleção dos fagos reativos a anticorpos anti-*Leishmania* ocorreu com sucesso.

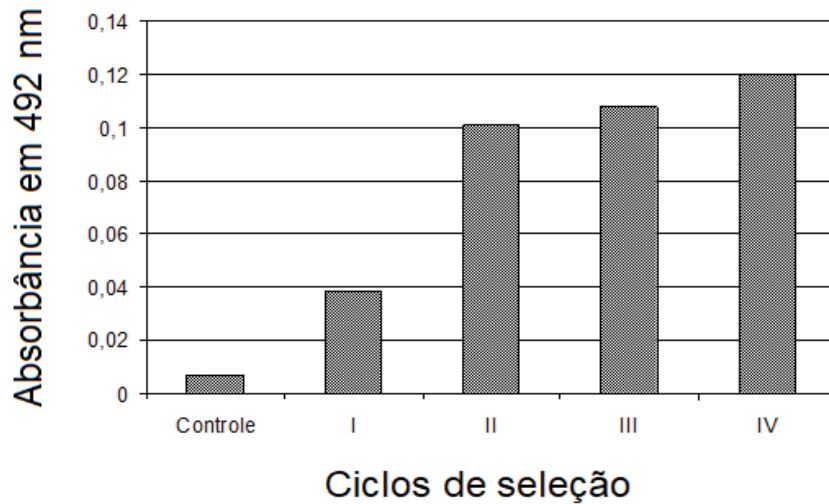
TABELA 2 - ENTRADA E SAÍDA DOS FAGOS OBTIDOS POR BIOPANNING USANDO PHAGE DISPLAY COM ANTICORPOS ANTÍGENO ESPECÍFICOS.

Ciclos de Seleção	Entrada de fagos (UFC)	Saída de fagos (UFC)	% de fagos ligados ($\times 10^{-2}$)
1	$2.9 \cdot 10^{11}$	$3.6 \cdot 10^5$	0.012
2	$2.0 \cdot 10^{11}$	$3.8 \cdot 10^7$	1.900
3	$2.0 \cdot 10^{11}$	$6.6 \cdot 10^7$	3.300
4	$2.0 \cdot 10^{11}$	$9.8 \cdot 10^7$	4.900

FONTE: O autor (2020).

A avaliação da reatividade de cada ciclo de seleção do *phage display* por ELISA apresentou aumento progressivo na intensidade da reação do primeiro até o quarto ciclo de seleção (FIGURA 16).

FIGURA 16 - REAÇÃO ANTÍGENO ANTICORPO POR TESTE ELISA, MOSTRANDO O AUMENTO DA REATIVIDADE EM CADA CICLO DE SELEÇÃO.



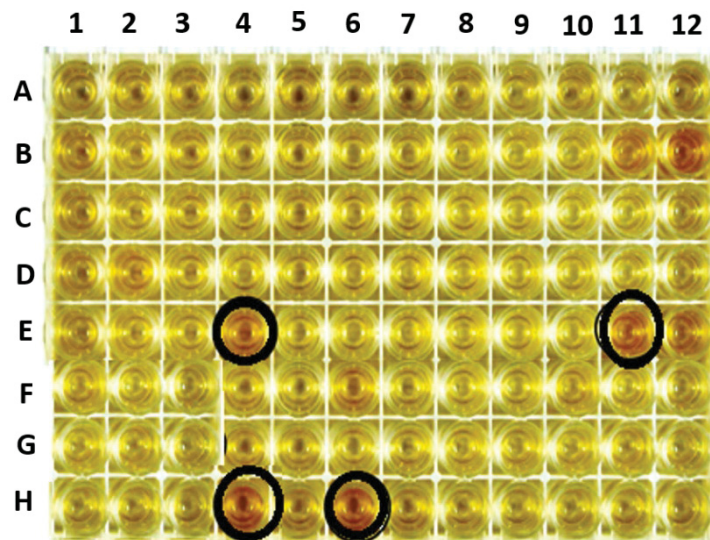
FONTE: O autor (2020).

NOTA: Uma placa de ELISA foi sensibilizada com 5 µg/mL de anti-fago e incubada com fagos (10^9 /poço) dos ciclos de seleção I, II, III, IV. Depois, anticorpos anti- *L. amazonensis* foram adicionados. A detecção da reação foi feita com anticorpos anti-Balb C específicos à porção Fc de IgGs conjugados com peroxidase e OPD como cromógeno

5.6 SELEÇÃO DOS CLONES

As colônias oriundas da amplificação dos fagos do quarto ciclo de seleção foram cultivadas em meio LB em placas de 96 poços. Cada clone foi testado por ELISA usando o sobrenadante da cultura e o soro de dois animais com absorbância coletados nos dias 75 e 90 após a infecção experimental; portanto, 512 clones foram testados. Dentre esses, 120 foram reativos para o soro de animais infectados experimentalmente com *L. amazonensis*. Na FIGURA 17, temos a visualização de uma das placas testadas, onde o A1 representa o controle negativo, e o B11 e B12 representam os controles positivos.

FIGURA 17 - TESTE ELISA PARA SELEÇÃO DOS FAGOS REAGENTES CONTRA SOROS DE ANIMAIS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CONTENDO ANTICORPOS ANTI- *Leishmania*.



FONTE: O autor (2020).

NOTA: O teste ELISA foi realizado com pool de soros de todos os animais positivos na diluição de 1:100 e conjugado na diluição de 1:10.000. O poço A1 representa o soro controle negativo e os poços B11 e 12, o controle positivo. Os poços circutados correspondem aos peptídeos selecionados neste estudo (ver seção resultados).

5.7 SEQUÊNCIA DOS PEPTÍDEOS

Após a extração do DNA dos fagos, eles foram sequenciados e foram obtidas 4 sequências de peptídeos diferentes (TABELA 3).

TABELA 3 - SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS POR PHAGE DISPLAY.

Nº	Sequência dos Peptídeos
1	T C H P Met D D P Q S C Y
2	A C Y E V H P F D R C P
3	Q C S P Y S P W G Q C A
4	Y C P W G Y C Q

FONTE: O autor (2020).

Essas sequências foram comparadas com outras depositadas no GenBank para verificar a homologia com proteínas de *Leishmania* spp. Esses resultados estão apresentados nas TABELAS de 4 a 7 a seguir, onde:

- Descrição – Breve descrição da sequência.
- Max Score – escore máximo resultante do pareamento de um segmento do peptídeo e da proteína.
- Total Score – escore resultante da soma de todos os segmentos pareados.

- Query Cover – Porcentagem da sequência submetida que é coberta pelo programa.
- E Value – Parâmetro de confiança.
- Percentual de Identidade - Identidade máxima coberta por um segmento alinhado.

TABELA 4 - HOMOLOGIA DE PROTEÍNAS DE *Leishmania* spp. EM RELAÇÃO AO PEPTÍDEO 1.

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Percentual de Identidade	Acesso
serine/threonine-protein kinase-like protein [<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]	23.5	23.5	75%	6.4	61.54%	XP_003875255.1
ATP-NAD kinase-like protein [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin]	22.7	36.1	75%	13	53.85%	XP_001680816.1
Putative protein kinase-like protein [<i>Leishmania</i> spp.]	21.8	21.8	83%	26	58.33%	XP_010703370.1 CCM20015.1 XP_001569069.1
hypothetical protein, conserved [<i>Leishmania tarentolae</i>]	21.8	21.8	41%	26	100.00%	GET90164.1

FONTE: O autor (2020).

TABELA 5 - HOMOLOGIA DE PROTEÍNAS DE *Leishmania* spp. EM RELAÇÃO AO PEPTÍDEO 2.

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Percentual de Identidade	Acesso
putative vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase [<i>Leishmania</i> spp.]	23.5	23.5	66%	6.4	75.00%	XP_001562566.1 XP_001680972.1 SUZ39253.1 AYU76239.1 SYZ63033.1 XP_010704078.1 TPP45285.1 XP_003858511.1 XP_003392226.1

FONTE: O autor (2020).

TABELA 6 - HOMOLOGIA DE PROTEÍNAS DE *Leishmania* spp. EM RELAÇÃO AO PEPTÍDEO 3.

(continua)

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Percentual de Identidade	Acesso
conserved hypothetical protein [<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103]	24.8	24.8	100%	2.2	64.29%	XP_003872452.1
conserved hypothetical protein [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	21.8	21.8	66%	26	58.33%	XP_001564924.1
hypothetical protein LPMP_220040 [<i>Leishmania panamensis</i>]	21.8	21.8	66%	26	58.33%	XP_010699006.1

TABELA – 6 HOMOLOGIA DE PROTEÍNAS DE *Leishmania* spp. EM RELAÇÃO AO PEPTÍDEO 3.

(conclusão)

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Percentual de Identidade	Acesso
hypothetical protein, conserved [<i>Leishmania guyanensis</i>]	21.8	21.8	66%	26	58.33%	CCM15541.1
hypothetical_protein [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	21.8	21.8	66%	26	58.33%	SYZ65830.1
hypothetical protein LPMP_231230 [<i>Leishmania panamensis</i>]	21.8	21.8	66%	26	75.00%	XP_010699280.1
conserved hypothetical protein [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	21.8	21.8	66%	26	75.00%	XP_001565191.1
hypothetical_protein [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	21.8	21.8	66%	26	75.00%	SYZ66099.1
hypothetical protein, unknown function [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	21.8	33.9	91%	26	61.54%	XP_001463227.1
hypothetical_protein conserved [<i>Leishmania donovani</i>]	21.8	33.9	91%	26	61.54%	VDZ42152.1

FONTE: O autor (2020).

TABELA 7 - HOMOLOGIA DE PROTEÍNAS DE *Leishmania* spp. EM RELAÇÃO AO PEPTÍDEO 4.

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Percentual de Identidade	Acesso
hypothetical protein, conserved [<i>Leishmania</i> spp.]	20.6	20.6	50%	32	100.00%	CCM18716.1 GET92017.1 VDZ48095.1 XP_003864097.1 XP_001468318.1 XP_001568054.2 XP_001686021.1 SUZ45284.1
hypothetical protein CGC20_10105 [<i>Leishmania donovani</i>]	20.6	20.6	50%	32	100.00%	TPP55427.1
hypothetical protein CGC21_37290 [<i>Leishmania donovani</i>]	20.6	20.6	50%	32	100.00%	TPP53607.1
hypothetical protein LPMP_332710 [<i>Leishmania panamensis</i>]	20.6	20.6	50%	32	100.00%	XP_010702362.1
hypothetical protein LdCL_330034400 [<i>Leishmania donovani</i>]	20.6	20.6	50%	32	100.00%	AYU82255.1
hypothetical protein BN143_0200820 [<i>Leishmania guyanensis</i>]	20.6	20.6	50%	32	100.00%	CCM35918.1

FONTE: O autor (2020).

Os peptídeos de 1 a 4 foram sintetizados com a adição de uma sequência de duas lisinas e uma glicina (KKG) para auxiliar na hidrofiliabilidade dos peptídeos e solubilização. Os peptídeos sintetizados foram encaminhados para as análises *in silico* e *in vitro*.

5.8 ANÁLISE *IN SILICO* DOS PEPTÍDEOS PARA AVALIAR A RESPOSTA IMUNE

5.8.1 Predição dos epítomos indutores de IFN- γ .

A análise realizada pela ferramenta IFNepitope, desenvolvida por Dhanda e colaboradores (2013a), mostrou que o peptídeo 2 apresenta potencial para a indução de IFN- γ (TABELA 8).

TABELA 8 - PREDIÇÃO DE PEPTÍDEOS INDUTORES DE IFN- γ .

Identificação	Peptídeo	Resultado	Score
P1	KKGTCHEMDDPQSCY	Não Indutor	-0,41387864
P2	KKGACYEVHPFDRCP	Indutor	0,017618051
P3	KKGQCSPYSPWGQCA	Não Indutor	-0,23853361
P4	KKGYCPWGYCQ	Não Indutor	-0,033047619

FONTE: O autor (2020).

5.8.2 Predição de epítomos indutores de IL-4.

A análise realizada pela ferramenta IL4Pred (DHANDA et al., 2013b) forneceu os resultados apresentados na TABELA 9.

TABELA 9 - PREDIÇÃO DE PEPTÍDEOS INDUTORES DE IL-4.

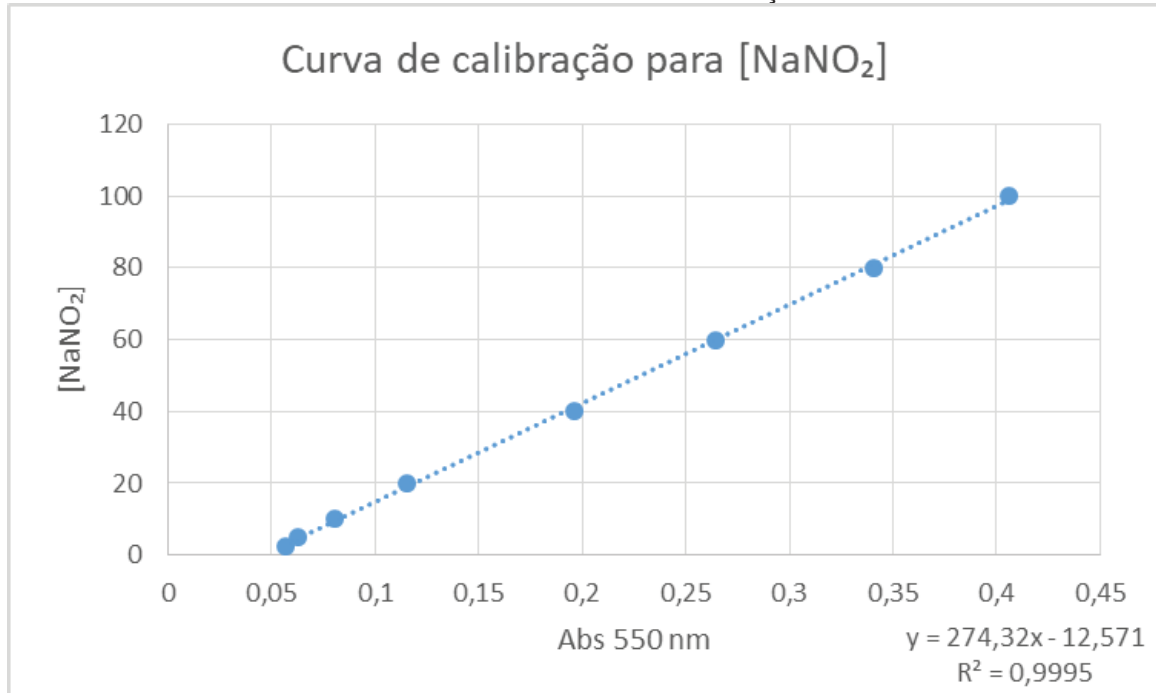
Nº	Peptídeo	Resultado	Score
1	KKGTCHEMDDPQSCY	Não indutor	0,13
2	KKGACYEVHPFDRCP	Indutor	0,29
3	KKGQCSPYSPWGQCA	Indutor	0,29
4	KKGYCPWGYCQ	Indutor	0.28

FONTE: O autor (2020).

5.9 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico, foi obtida pela dosagem de nitrito no sobrenadante do meio de cultivo, relacionando a absorbância 550 nm com a concentração de nitrito através da equação da reta obtida pela curva de calibração (FIGURA 18).

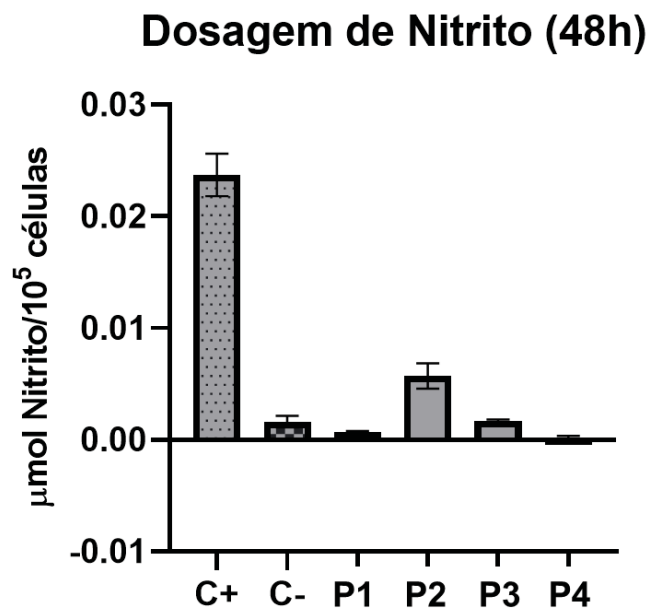
FIGURA 18 - CURVA DE CALIBRAÇÃO.



FONTE: O autor (2020).

Os resultados da análise da produção de óxido nítrico no intervalo de 48 h e 72 h estão apresentados nas FIGURAS 19 e 20 e TABELAS 10 e 11.

FIGURA 19 - DOSAGEM DE NITRITO (48 h).



FONTE: O autor (2020).

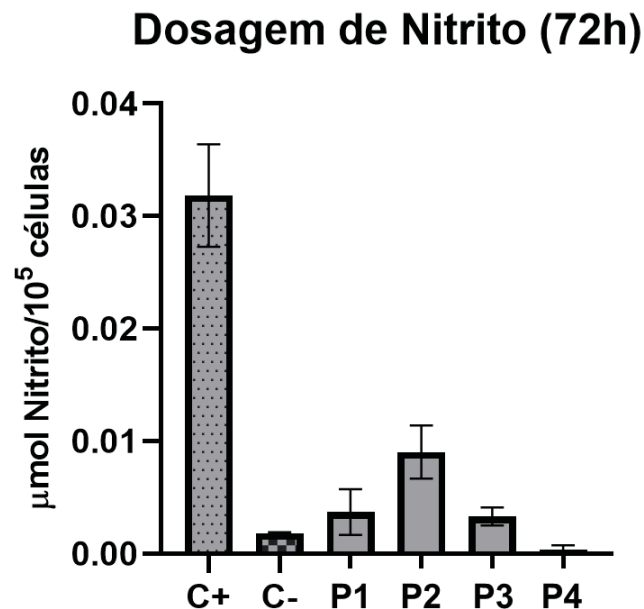
TABELA 10 - QUANTIDADE DE NITRITO PRODUZIDA PELAS CÉLULAS APÓS 48h DE INDUÇÃO.

Amostra	Quantidade de Nitrito ($\mu\text{mol}/10^5$ células)
P1	$7,14 \times 10^{-4}$
P2	$5,73 \times 10^{-3}$
P3	$1,70 \times 10^{-3}$

P4	$1,29 \times 10^{-4}$
LPS (C+)	$2,37 \times 10^{-2}$
Meio de Cultivo (C-)	$1,63 \times 10^{-3}$

FONTE: O autor (2020).

FIGURA 20 - DOSAGEM DE NITRITO (72 h).



FONTE: O autor (2020).

TABELA 11 - QUANTIDADE DE NITRITO PRODUZIDA PELAS CÉLULAS APÓS 72h DE INDUÇÃO.

Amostra	Quantidade de Nitrito ($\mu\text{mol}/10^5$ células)
P1	$3,71 \times 10^{-3}$
P2	$9,05 \times 10^{-3}$
P3	$3,31 \times 10^{-3}$
P4	$3,85 \times 10^{-4}$
LPS (C+)	$3,18 \times 10^{-2}$
Meio de Cultivo (C-)	$1,85 \times 10^{-3}$

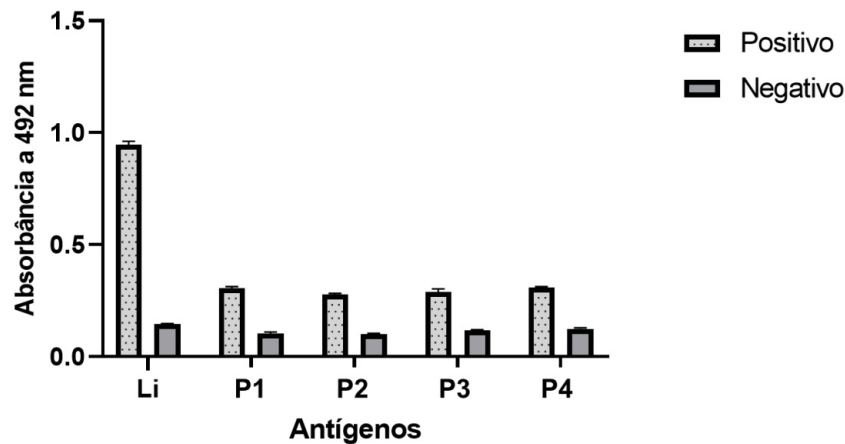
FONTE: O autor (2020).

Tanto no intervalo de tempo 48 h como no de 72 h, para um intervalo de confiança de 95%, as células tratadas com o peptídeo 2 apresentaram diferença significativa em sua produção de óxido nítrico em relação ao controle negativo.

5.10 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Os quatro peptídeos foram testados por ELISA para avaliar a sua capacidade de reconhecer soros de animais positivos e negativos para LVC. A FIGURA 21 apresenta o gráfico dos resultados dos testes de ELISA para os quatro peptídeos em comparação com o antígeno de *L. infantum* utilizado como controle.

FIGURA 21 - TESTE ELISA PARA AVALIAR A CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE SOROS POSITIVOS E NEGATIVOS



FONTE: O autor (2020).

Para identificar quais peptídeos apresentaram melhores resultados na diferenciação dos soros positivos e negativos, foi feita uma escala de pontuação de 0 até 1, denominada ELISA score. Esta escala de pontuação consiste na razão entre a diferença das absorbâncias dos soros positivos e negativos e a absorbância dos soros positivos, como mostrado a seguir, para cada peptídeo utilizado como antígeno, incluindo o antígeno de *L. infantum* utilizado como controle.

$$ELISA\ score = \frac{Absorbância\ pool\ positivo - Absorbância\ pool\ negativo}{(Absorbância\ pool\ positivo)}$$

Os resultados do score obtidos no teste ELISA para cada um dos peptídeos mostrou uma variação de 0,593 a 0,658 (TABELA 12).

TABELA 12 - ELISA SCORE

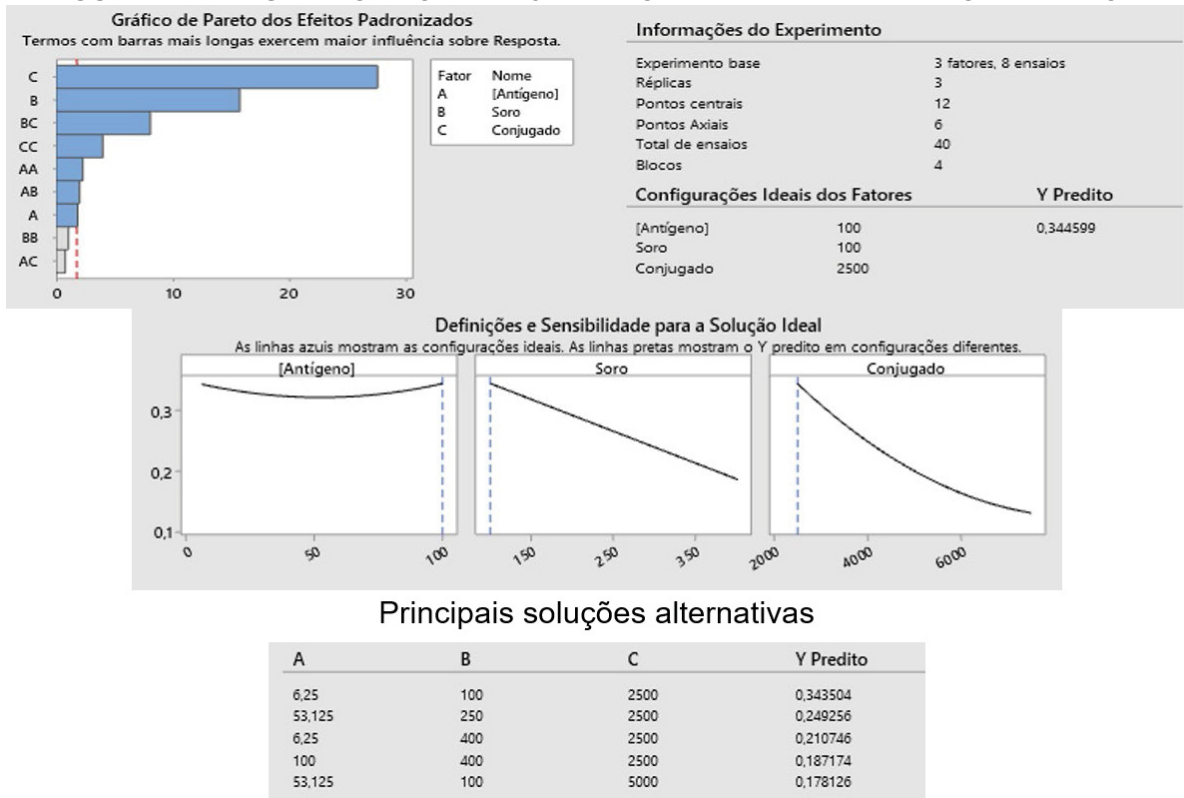
Antígeno	ELISA score
P1	0,658
P2	0,636
P3	0,593
P4	0,596
Li	0,846

FONTE: O autor (2020).

Os peptídeos P1 e P2 apresentaram os melhores resultados e foram padronizados para sua utilização em ELISA através de um planejamento experimental utilizando o Minitab® Statistical Software. A partir da análise dos resultados do gráfico de

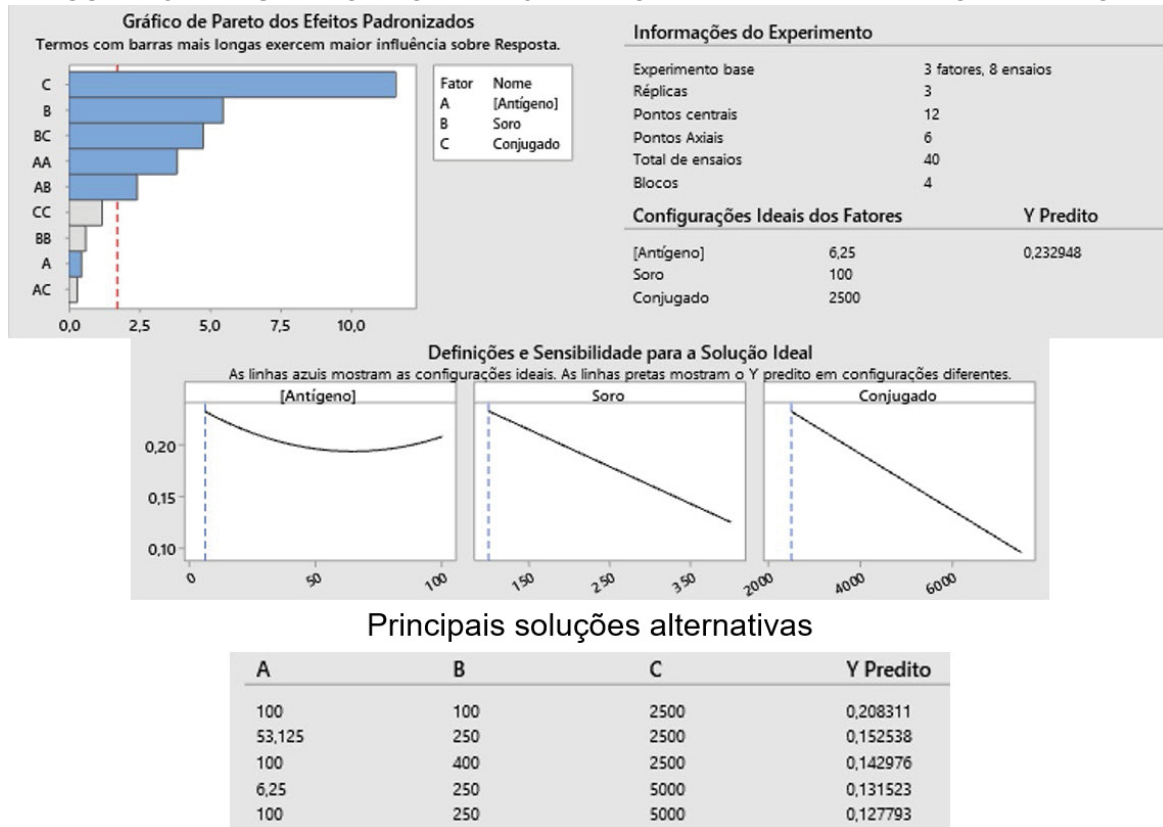
Pareto dos efeitos padronizados e do comportamento da absorbância em função da variação dos fatores desse planejamento (FIGURAS 22 e 23), as condições de uso foram padronizadas de modo a obter a maior diferença entre as absorbâncias dos soros positivos e negativos indicada nas figuras pelo Y predito.

FIGURA 22 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA O PEPTÍDEO 1.



FONTE: O autor (2020).

FIGURA 23 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA O PEPTÍDEO 2.



FONTE: O autor (2020).

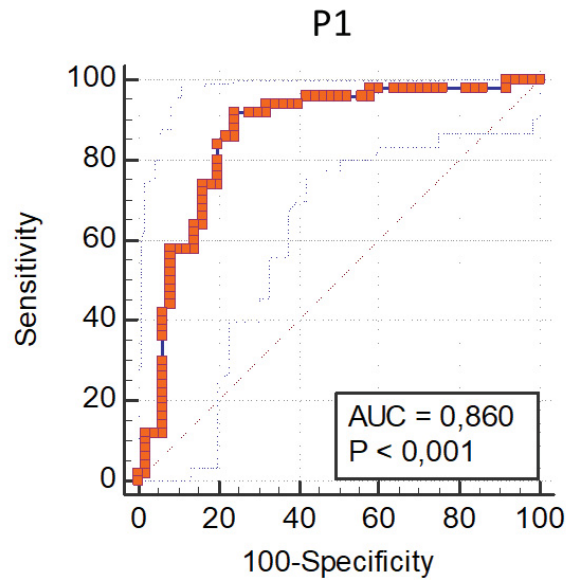
A modelagem feita, a partir dos resultados do planejamento experimental, indicou que as condições ideais para de uso para o P1 resultava em um Y predito muito semelhante ao valor obtido por uma das soluções alternativas. Porém, esta solução alternativa indicava a utilização de uma concentração de antígeno consideravelmente menor em comparação a condição ideal apresentada. Sendo assim, optou-se por utilizar as condições indicadas pela solução alternativa que resultava nos maiores valores para o Y predito. Já a modelagem feita para o P2 apresentou um Y predito para as condições ideais visivelmente destacado em comparação às soluções alternativas. As configurações padronizadas para ambos os peptídeos foram 6,25 ng de peptídeo por poço, diluição de soro 1:100 e diluição de conjugado 1:2500.

Essas foram as condições utilizadas para realizar os testes de sensibilidade e especificidade dos peptídeos, utilizando soros de 50 animais positivos (oriundos de zona endêmica de LV) e 50 animais negativos para LVC (vindos da Região Metropolitana de Curitiba, área não endêmica).

A avaliação segundo MedCalc do P1, em uma população apresentou sensibilidade de 92% e especificidade de 76%, com área abaixo da curva igual a 0,860. O índice Youden, que mede o desempenho de um teste diagnóstico variando seus

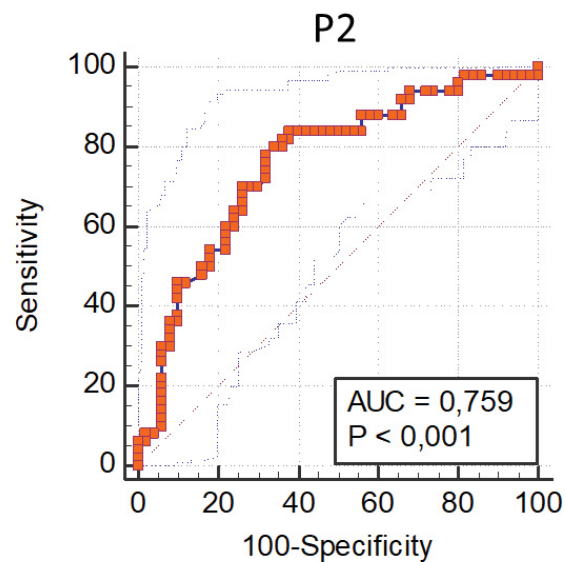
resultados de 0 a 1 (sendo 1 o ideal), foi igual a 0,68 para um *cutoff* de 0,168 (FIGURA 24). Já o P2 apresentou sensibilidade de 84% e especificidade de 62%, com área abaixo da curva igual a 0,759 e índice Youden igual a 0,460 para um *cutoff* de 0,149 (FIGURA 25).

FIGURA 24 - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO P1 PARA LVC.



FONTE: O autor (2020).

FIGURA 25 - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO P2 PARA LVC.



FONTE: O autor (2020).

6 DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos demonstram que a técnica de *phage display* para a obtenção dos peptídeos mimótopos de proteínas de *Leishmania* spp. foi bem sucedida. Foi possível selecionar quatro diferentes sequências de aminoácidos, expressas pelos clones de fagos, que foram reconhecidas por anticorpos específicos anti-*L. amazonensis*. Além disso, as sequências obtidas apresentaram potencial para serem usadas como antígenos para a diferenciação entre soros positivos e negativos em testes diagnósticos para LVC e potencial para indução da ativação da resposta celular em cultura de macrófagos.

A purificação das IgGs obtidas, a partir dos soros dos animais infectados experimentalmente, foi comprovada por meio da técnica SDS-PAGE. Essas proteínas foram obtidas utilizando a técnica de precipitação com sulfato de amônio, conhecida como *salting out*, que consiste na diminuição da solubilidade de uma proteína conforme o aumento da força iônica de uma solução altamente carregada, que pode ser usada para IgGs de várias espécies de animais (HEIDE; SCHWICK, 1978; DUONG-LY; GABELLI, 2014). As IgGs foram purificadas por cromatografia de afinidade a proteína G, que é derivada de alguns grupos de *Streptococcus* e possui alta afinidade com a porção Fc de IgGs (PAGE; THORPE, 2002). A seleção das IgGs específicas contra antígenos de *Leishmania* foi realizada através da ligação específica entre essas proteínas e o AS de *L. amazonensis* em membrana de PVDF. Essa seleção representa uma etapa importante para o prosseguimento com a técnica de *phage display*, tendo em vista a seleção de epítomos específicos contra *Leishmania* spp. A especificidade das IgGs obtidas foi constatada pela técnica de western blot, que reagiu ao produto final da purificação contra AS de *L. amazonensis*.

Graças a técnica ELISA, foi possível observar o aumento da reatividade das partículas virais diante das IgGs específicas após cada ciclo de seleção da etapa de *phage display*. Adicionalmente, o fato da quantidade de fagos eluída após cada ciclo ser maior que a anterior é indicativo do aumento da quantidade de fagos específicos. Depois da amplificação dos fagos e avaliação da reatividade e das sequências, quatro peptídeos foram sintetizados e analisados *in silico* e *in vitro*.

Todos os peptídeos apresentavam similaridades a diferentes proteínas de diferentes espécies de *Leishmania*. Porém, uma análise mais completa da homologia é consideravelmente mais complexa pelo fato dos peptídeos obtidos por *phage display* serem mimótopos conformacionais, o que acaba dificultando o alinhamento das

sequências. Exigindo, portanto, uma análise das estruturas tridimensionais das proteínas para realizar a identificação mais exata de quais proteínas são mimetizadas.

Os peptídeos obtidos neste trabalho tiveram suas sequências analisadas *in silico* para avaliar seu potencial na indução da produção de IFN- γ e IL-4, citocinas que estão relacionadas à resposta imune mediada por Th1 e Th2 respectivamente. Visto que o estímulo de uma resposta Th1 em detrimento da resposta Th2 é muito importante para o combate da infecção por *Leishmania* spp. (BARBIERI, 2006; JAIN; JAIN, 2015). Uma vacina baseada no antígeno de *L. braziliensis*, utilizando saponina como adjuvante e associada a antígenos de saliva de *Lu. longipalpis*, descrita como capaz de induzir uma resposta imune robusta por conferir redução da carga parasitária em cães infectados, induz uma resposta imune predominantemente do tipo Th1 com altos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-12 e baixos níveis de IL-4 e TGF- β após o desafio com *L. infantum* (RESENDE et al., 2016). Em estudo realizado por Giunchetti et al. (2019) observou-se que essas duas citocinas, IFN- γ e IL-4, estão entre os principais biomarcadores utilizados para avaliar vacinas quanto a imunogenicidade e proteção contra LVC. Sendo que a proteção está relacionada com altos níveis de IFN- γ e níveis reduzidos de IL-4 (GIUNCHETTI et al., 2019). A sequência do P2, foi a única dentre as quatro sequências submetidas a avaliação predita como indutora de IFN- γ . Indicando que essa sequência possui potencial para estimular e desencadear uma resposta imune celular. O P2 também foi predito como indutor de IL-4, juntamente com o P3 e o P4 indicando que o P2 apresenta características em sua composição comuns tanto a epítomos indutores de IFN- γ quanto de IL-4, o que acaba evidenciando a necessidade de avaliar mais profundamente o papel dessa molécula na modulação da resposta celular por meio de testes *in vitro* e *in vivo*.

A avaliação da indução da produção de óxido nítrico por meio da dosagem de NO $_2^-$ indicou que as células estimuladas com o P2 produziram 3,5 vezes mais NO do que o controle negativo, que consistia em macrófagos sem estímulo, no intervalo de 48 h de cultivo. Em comparação, indução da produção de NO mostrou-se superior no intervalo de 72 h de cultivo, indicando uma quantidade de NO produzida 5 vezes maior do que os níveis basais representados pelo controle negativo. Os peptídeos P1 e P3 também apresentaram aumento em relação aos níveis basais no intervalo de 72 h de cultivo. Porém, esses valores não apresentaram diferença significativa no intervalo de confiança de 95%. Os resultados obtidos mostram que o P2 foi capaz de induzir a ativação da resposta celular no meio de cultivo, sendo assim uma molécula promissora para estudos de imunogenicidade em animais.

Essa análise é muito utilizada para avaliar a ativação da resposta imune celular por alguma molécula em estudos para a formulação vacinas ou tratamento da leishmaniose. Kangusso-Marcolino e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos de quatro diferentes polissacarídeos quanto à sua atividade anti-*Leishmania*. No estudo, três desses polissacarídeos promoveram um aumento na produção de óxido nítrico variando de 71% a 110% em comparação aos níveis basais. Esses resultados apontam que essas moléculas exercem atividade anti-*Leishmania*, e portando seriam promissoras para o tratamento da leishmaniose. Qureshi et al. (2019), estudando o papel da proteína fosfatase 1 de *Leishmania donovani* (LdPP1) na imunomodulação em macrófagos humanos, identificaram o aumento na produção de óxido nítrico em células estimuladas por essa proteína. Indicando o potencial dessa proteína para a ativação celular e proteção contra a infecção. Em estudo realizado por Nan, Bang e Shin. (2009) foi possível observar o potencial anti-inflamatório da indolicidina e outros peptídeos análogos, visto que essas moléculas suprimiram a produção de NO em células de macrófagos murinos estimuladas com LPS.

Nos testes ELISA utilizando *pool* de soros de cães positivos e negativos para LVC, os peptídeos P1 e P2 apresentaram os melhores resultados na diferenciação entre os soros positivos e negativos apresentando uma pontuação no ELISA score de 0,658 e 0,636 respectivamente. O planejamento experimental, visando otimizar o desempenho dessas moléculas no diagnóstico por ELISA, determinou as condições ideais para a concentração de antígeno (6,25 ng/poço), diluição do soro (1:100) e diluição do conjugado (1:2500) a serem usadas nos testes para ambos os peptídeos.

Quando avaliado frente a soros de 50 cães soropositivos para LVC e 50 cães soronegativos o P1 apresentou sensibilidade de 92% e especificidade de 76%, indicando que o peptídeo apresenta boa capacidade em reconhecer soros de animais positivos para a doença. Contudo seu valor de especificidade necessita ser otimizado, o que pode ser realizado através da utilização desse peptídeo em um *mix* com outros peptídeos ou na composição de uma proteína de quimera. O P2 apresentou sensibilidade e especificidade de 84% e 62% respectivamente, no entanto, apresentou melhor resposta para a imunidade celular.

Vários estudos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de leishmaniose por ELISA utilizando proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos. Em trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, Link e colaboradores (2017) obtiveram três peptídeos a partir de *phage display* com anticorpos de pacientes infectados com *L. braziliensis*. Esses peptídeos foram testados individualmente e em um *mix* quanto ao seu potencial

imunogênico em experimentos de imunização de hamsters e quanto à sua utilização em sorodiagnósticos. O *mix* dos peptídeos e o P1 apresentaram sensibilidade de 79% e 72% respectivamente e especificidade variando de 78% a 100% no diagnóstico de LC. Salles et al. (2017) utilizaram a técnica de *phage display* em três etapas. As duas primeiras realizando uma seleção negativa dos fagos ligantes a IgGs de indivíduos saudáveis e de pacientes com doença de Chagas. E por fim uma seleção positiva dos fagos ligantes a IgGs de pacientes com LV. Após os ciclos de seleção, oito clones foram selecionados e utilizados no sorodiagnóstico de LV, apresentando alta sensibilidade e especificidade frente a um painel de soros humanos. Chávez-Fumagalli et al. (2013) publicaram um estudo onde três peptídeos sintéticos baseados em epítomos de células B apresentaram sensibilidade e especificidade acima de 75% e 90% respectivamente. Testes utilizando a proteína miristoilada pequena 3 (SMP-3) e um peptídeo sintético baseado em um epítipo linear da SMP-3 apresentaram sensibilidade e especificidade acima de 90% tanto para LVC quanto para LTA (SALLES et al., 2019).

Em trabalho desenvolvido por De SOUZA et al. (2019), uma proteína recombinante baseada em um gene relacionado a cinesina de *L. braziliensis* (Lbk39) foi produzida em *L. tarentolae*. Essa proteína foi testada por ELISA frente a soros de 74 pacientes humanos de LC e 11 pacientes humanos de LV. Os resultados obtidos nos testes ELISA de sensibilidade e especificidade foram de 88% e 98% respectivamente para LC, e 100% de sensibilidade e especificidade para LV. Além disso, essa proteína quando testada como antígeno para o diagnóstico de LVC, frente a 78 soros de animais positivos e 75 negativos, apresentou ótimos resultados de sensibilidade (100%) e especificidade (96,1%), enquanto o antígeno solúvel de *L. amazonensis* apresentou sensibilidade de 98,1% e especificidade de 86,9% (PEREIRA et al., 2020, no prelo).

Na TABELA 13, é apresentada uma comparação dos resultados de sensibilidade e especificidade entre os testes envolvendo os peptídeos aqui avaliados e outros testes utilizados para o sorodiagnóstico de LVC.

TABELA 13 - COMPARAÇÃO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ENTRE DIFERENTES ESTUDOS ENVOLVENDO O DIAGNÓSTICO DE LVC.

Teste	Sensibilidade	Especificidade	Estudo	Observações
ELISA P1	92%	76%	Presente Estudo	-
ELISA P2	84%	62%	Presente Estudo	-
DPP	47%	96%	GRIMALDI et al., 2012	Animais sem sinais clínicos
DPP	97,9%	93,6%	RIBEIRO et al., 2019	-
DPP	87,5 – 88%	73,3 – 69,2%	SCHUBAH et al., 2014	-
Kalazar Detect	79,6%	95,7%	RIBEIRO et al., 2019	-
ALERE	73,6%	97,8	RIBEIRO et al., 2019	-
ELISA rK39 e LinTXNPx	87,1	96,3 – 99%	SANTAREM et al., 2010	-

FONTE: O autor (2020).

É possível observar que o peptídeo P1 apresenta boa sensibilidade, quando comparado a outros testes como o teste rápido DPP®, que apresenta diferentes valores para sensibilidade e especificidade em diferentes estudos (GRIMALDI et al., 2012; SCHUBAH et al., 2014; RIBEIRO et al., 2019); Kalazar Detect™, ALERE® (RIBEIRO et al., 2019) e testes ELISA utilizando uma proteína recombinante de *L. infantum* e a rK39 (SANTAREM et al., 2010). Além disso o P1 apresenta resultados de especificidade superiores aos descritos por Schubah et al. (2014) avaliando o teste DPP. Através dessa comparação, pode-se observar que o P1 apresenta potencial para ser utilizado em testes de triagem para diagnóstico da LVC.

7 CONCLUSÃO

A obtenção de peptídeos mimótopos de proteínas de *Leishmania spp.* através da técnica de *phage display* foi bem sucedida.

Dentre os peptídeos sintetizados, o P1 apresentou os melhores resultados na diferenciação entre soros de cães positivos e negativos para LVC. Os resultados dos testes de sensibilidade e especificidade indicaram que o P1 apresenta boa capacidade de diagnosticar corretamente soros positivos para LVC, porém a acurácia do diagnóstico de soros negativos ainda necessita de otimização. Propõe-se a utilização desse peptídeo em um *mix* com outros peptídeos ou em uma proteína de fusão a fim de aumentar a sensibilidade e a especificidade. Além disso, os quatro peptídeos ainda necessitam ser avaliados quanto a sua utilização no diagnóstico de LC e LV humana.

O P2 apresentou bons resultados na ativação da resposta celular pela indução da produção de óxido nítrico. Indicando potencial para a utilização desse peptídeo na formulação de vacinas contra leishmaniose. Em estudos subsequentes recomenda-se a formulação desse peptídeo em uma proteína carreadora para testes vacinais *in vivo* a fim de elucidar sua capacidade de estimular uma resposta imune celular e gerar proteção contra leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ABAD, L. P.; ALMEIDA, C. S.; MATTOS, A. M. M.; MENDONÇA, A. C. P.; ALVES, M. J. M.; et al. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 166, p. 133-138, 2017.
- AGALLOU, M.; SMIRLIS, D.; SOTERIADOU, K. P.; KARAGOUNI, E. Vaccination with *Leishmania* histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 30, n. 34, p. 5086-5093, 2012.
- AGHEBATI-MALEKI, L. et al. Phage display as a promising approach for vaccine development. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 66, 2016.
- ALBAN, S. M. **Uso de peptídeos para o diagnóstico imunológico da hanseníase**. Tese (Curso de Pós-Graduação em Processos biotecnológicos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ALBAN, S. M.; de MOURA, J. F.; MINOZZO, J. C.; MIRA, M. T.; VANETE THOMAZ-SOCCOL, V. Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 42, 2013.
- ALBAN, S. M.; de MOURA J. F.; THOMAZ-SOCCOL, V.; BÜHRER SÉKULA S.; ALVARENGA, L. M.; MIRA, M. T. et al. Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. **PLOS ONE**, v.29 n. 9, 2014.
- ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. D.; WHO leishmaniasis control team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS ONE**, v.7, 2012.
- ANTUNES, C. M. et al, Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis, **International Journal Epidemiology**, n.155, p. 72–80, 1986.
- ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; GRADONI, L. The anti-parasitic effects of nitric oxide. **IUBMB Life**, v. 55, n. 10, p. 573–578, 2003.
- BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329–337, 2006.

BAZAN, J.; CALKOSINSKI, I.; GAMIAN, A. Phage display--a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 12, p. 1817 – 1828, 2012.

BISETTO JUNIOR, A.; PASQUALI, A. K. S.; LEANDRO, A. S.; POZZOLO, E. M.; NAVARRO, I. T.; CHIYO, L.; BREGANÓ, R. M.; DIAS, R. C. F.; FRIEDRICH, R.; FREIRE, R. L.; THOMAZ SOCCOL. **Manual Técnico de Leishmanioses Caninas**: Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral. CRMV-PR, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério Da Saúde. **Nota técnica N° /2011 – UVR/CGDT/DEVEP/SVS/ MS, 2011**. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. MS, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1 ed. Brasília: **Editora MS**, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota Técnica N° 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, de 01 de setembro de 2016**. Informa sobre o tratamento de cães com leishmaniose visceral e sua implicação nas ações de vigilância e controle dessa doença em humanos. MAPA, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância e Saúde. 1. Ed. Brasília: **Editora MS**, p 521 – 542, 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília: **Editora MS**, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 04 de maio de 2020a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 29 de Abril. 2020b.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A.A.F.; FILHO, J.D.A. Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas - A Mini Review. **Entomology, Ornithology and Herpetology**, v. 4, n. 144, 2015.

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

- CARSON, C.; QUINNELL, R. J.; HOLDEN, J.; GARCEZ, L. M.; DEBORGGRAEVE, S.; et al. Comparison of *Leishmania* OligoC-Test PCR with conventional and real-time PCR for Diagnosis of canine *Leishmania* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 3325-3330, 2010.
- CARVALHO, A. M. R. S., MENDES, T. A., de, O., COELHO, E. A. F., DUARTE, M. C., e MENEZES-SOUZA, D. New antigens for the serological diagnosis of human visceral leishmaniasis identified by immunogenomic screening. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, 2018.
- CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C. Standardization of ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) techniques for caninecutaneous leishmaniasis. In: ROUSSOS, S. et al. **New Horizons in Biotechnology**. [Kluwer Academic Publishers, p. 421-428, 2003.
- CERUTTI, P. H. P. et al. Métodos diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar Americana: Uma Revisão de Literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55, 2017.
- CHAPPUIS, F. et al., Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873–882, 2007.
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MARTINS, V. T.; TESTASICCA, M. C. S. et al. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 835–841, 2013.
- COELHO, E. A. F. et al. Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 370 – 379, 2015.
- COSTA, L. E. et al. Phage-fused epitopes from *Leishmania infantum* used as immunogenic vaccines confer partial protection against *Leishmania amazonensis* infection. **Parasitology**, v. 142, n. 10, p. 1335 – 1347, 2015.
- COSTA, L. E. et al. Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 14–22, 2017.
- COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D.; LEAL, G. G.; MOREIRA, N. D.; OLIVEIRA, L. A.; de MENEZES MACHADO, E. M.; MORAIS, M. H.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1-6, 2014.
- De BRITO, R. C. F. et al. Peptide Vaccines for Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1043, 2018.
- De SOUZA, L. M. B.; CARVALHO, J.; BATES, M. D.; PETTERLE, R. R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; BATES, P. A. Production of a kinesin-related recombinant protein (Lbk39)

from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. **One Health**, v. 8, p. 100111, 2019.

DHANDA, S, K, et al., Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders, **Biology Direct**, 2013a.

DHANDA S, K, et al., Prediction of Interleukin-4 inducing peptides, **Clinical and developmental immunology**, 2013b.

DUONG-LY, K.; GABELLI, S. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. **Methods in enzymology**, v. 541, p. 85-94, 2014.

EVANS, K. J.; KEDZIERKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**, 2012.

FERNANDES, A. P., COELHO, E. A., MACHADO-COELHO, G. L., GRIMALDI JR., G., GAZZINELLI, R. T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 476-485, 2012.

FERNANDES, C. B. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1287–1295, 2014.

FREIRE, M. L. **Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DATLPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana – Belo Horizonte**, 2017.

FOLGORI, A.; TAFI, R.; MEOLA, A.; FELICI, F.; GALFRE, G.; CORTESE, R. et al. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 9, p. 2236–2243, 1994.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Veterinary Parasitology**. V. 271, p. 87 – 97, 2019.

GRAY, B. P.; BROWN, K. C. Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 2, p. 1020–1081, 2013.

GRIMALDI, G. Jr; TEVA, A.; dos-SANTOS, C. B.; SANTOS, F. N.; PINTO, I. S.; FUX, B.; et al. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, 2017.

GUEDES, D. C.; PASQUALI, A. K. S.; MINOZZO, J. C.; FAULDS, C.; PETTERLE, R. R.; SOCCOL, C. R.; THOMAZ-SOCCOL, V. Biological evaluation of mimetic peptides as active molecules for a new and simple skin test in an animal model. **Parasitology Research**, v. 118, p. 317–324, 2019.

GUPTA, R., KUSHAWAHA, P. K., TRIPATHI, C. D., SUNDAR, S., DUBE, A. A novel recombinant *Leishmania donovani* p45, a partial coding region of methionine aminopeptidase, generates protective immunity by inducing a Th1 stimulatory response against experimental visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 429, 2012.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: a laboratory manual. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory**, p. 726, 1988.

HEIDE, K.; SCHWICK, H. G. Salt fractionation of immunoglobulins, in **Handbook of Experimental Immunology**, 3rd ed. (Weir, D. M., ed.), chap. 7. Blackwell Scientific, Oxford, 1978.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1–12, 2015.

KHURANA, S.; SUGUITAN JR AL.; RIVERA, Y.; SIMMONS, CP.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. et al. Antigenic fingerprinting of H5N1 avian influenza using convalescent sera and monoclonal antibodies reveals potential vaccine and diagnostic targets. **PLOS Medicine**, v. 6, n. 4, 2009.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; NOLETO, G. R. et al. Acid heteropolysaccharides with potent antileishmanial effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 165-170, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAKHAL, S. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on crude *Leishmania* histone proteins for serodiagnosis of human infantile visceral leishmaniasis. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 19, p. 1487–1491, 2012.

LÉVÊQUE, M. F. et al. Place of Serology in the Diagnosis of Zoonotic Leishmaniases With a Focus on Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 67, 2020.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**, v. 145, n.12, p. 4306-4310, 1990.

LINK, J. S.; ALBAN, S. M.; SOCCOL, C. R.; PEREIRA, G. V. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Synthetic peptides as potential antigens for cutaneous leishmaniasis diagnosis. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

LIU, I. J.; HSUEH, P. R.; LIN, C. T.; CHIU, C. Y.; KAO, C. L.; LIAO, M. Y.; et al. Disease-specific B Cell epitopes for serum antibodies from patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) and serologic detection of SARS antibodies by epitope-based peptide antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 4, p. 797–809, 2004.

LOPES, J. V. **Epidemiologia da Leishmaniose Visceral no Município de Sabará, Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil** – Belo Horizonte, 2014.

LOWRY, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, S. C. M.; MOURA, K. V. R. A expansão da leishmaniose tegumentar americana no município de Montes Claros - Minas Gerais. **Revista brasileira de geografia médica e da saúde**, [Minas Gerais], v. 21, n. 11, p. 80-92, 2015.

MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C. M. C.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, 2012.

McGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MENEZES-SOUZA, D.; MENDES, T. A.; GOMES, M. de. S.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T. Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin I-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, 2015.

MERRIFIELD, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 32 (ed. F. F. Nord), 1969.

MODABBER, F. Leishmaniasis vaccines: past, present and future. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. 58–61, 2010.

MOURA, J.; ALVARENGA, L. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Biotechnological Role of Phage-Display Peptides for the Diagnosis of Neglected Tropical Diseases. In: THOMAZ-SOCCOL, V.; PANDEY, A. e RESENDE, R. R. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications**. Elsevier, 2017. p. 161 – 180.

NAGHAVI, M. et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 385, n. 9963, p. 117-171, 2015.

NAN, Y. H.; BANG, J. K.; SHIN, S. Y. Design of novel indolicidin-derived antimicrobial peptides with enhanced cell specificity and potent anti-inflammatory activity. **Peptides**, v. 30, n. 5, p. 832-838, 2009.

NOAZIN, S. et al. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine**, v. 26, n. 52, p. 6759 – 6767, 2008.

NOGUEIRA, F. S. et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasite and Vectors**, v. 12, n. 79, 2019.

NOLETO, G. R. et al. Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and their effects on peritoneal macrophages. **Carbohydrate Polymers**. v. 57, n. 2, p. 113–122, 2004.

PAGE, M.; THORPE, R. Purification of IgG Using Protein A or Protein G. **The Protein Protocols Handbook**, 2nd Edition; p. 993-994, 2002.

PEIXOTO, H. M. et al, Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis, **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 3, p. 334–352, 2015.

PEREIRA, J. C.; SOUSA, P. H. S.; De SOUZA, L. M. B.; PASQUALI, A. K. S.; BATES, M.; BATES, P.; THOMAZ-SOCCOL, V. The Recombinant Protein LbK39 Provides Excellent Results for the Diagnosis of Dogs With Visceral Leishmaniasis. **Parasitology**, 2020. No prelo.

PEREIRA, L. et al. Vaccination with *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 but Not with Nucleosomal Histones Proteins Controls *Leishmania infantum* Infection in Hamsters. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, 2015.

PETITDIDIER, E. et al. Peptide-based vaccine successfully induces protective immunity against canine visceral leishmaniasis. **Nature Part Journals Vaccines**, v. 4, n. 49, 2019.

PORROZZI, R.; SANTOS da COSTA, M. V.; TEVA, A. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544–548, 2007.

QURESHI, R.; JAKKULA, P.; SAGURTHI, S. R.; QURESHI, I. A. Protein phosphatase 1 of *Leishmania donovani* exhibits conserved catalytic residues and pro-inflammatory response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 516, n. 3, p. 770-776, 2019.

RABELLO, E. **Formes cliniques de la leishmaniose tégumentaire**, In: Congrès des Dermatologistes et Syphiligraphes de Langue Française, 1923.

RAMOS, F. F. et al. Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. **Parasites and Vectors**. v. 10, n. 617, 2017.

REED, S. G. et al. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4648–4654, 2007.

REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233–2239, 2016.

RESENDE, L. A. et al. Impact of LbSapSal Vaccine in Canine Immunological and Parasitological Features before and after *Leishmania chagasi*-Challenge. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.

REY, L. **Parasitologia**, ed.4, Rio de Janeiro, 2008.

RHAIEM, B. R.; HOUIMEL, M. Targeting *Leishmania major* parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. **Acta Tropica**, v. 159, p 11-19, 2016.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2010.

SALLES, B. C. S. et al. *Leishmania infantum* mimotopes and a phage–ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 3, p. 219-225, 2017.

SALLES, B. C. S. et al. Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 224, n. 1, p. 163-171, 2019.

SANTAMARIA, H.; MANOUTCHARIAN, K.; ROCHA, L.; GONZALEZ, E.; ACERO, G.; GOVEZENSKY, T. et al. Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from human papillomavirus-infected patients using phage display libraries. **Clinical Immunology**, v. 101, n. 3, p. 296–302, 2001.

SHIMABUKURO, P. H. F.; DE ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, n. 660, p. 67–106, 2017.

SHIO, M. T.; HASSANI, K.; ISNARD, A.; RALPH, B.; CONTRERAS, I.; GOMEZ, M. A.; ABU-DAYYEH, I.; OLIVIER, M. Host cell signalling and *Leishmania* mechanisms of evasion. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

SILVA, E. S. et al. Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Patient Infected With Human Immunodeficiency Virus. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 145-149, 2002.

SILVESTRE, R.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OUAISSI, A. Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 56, n. 123, 2008.

SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. Peptide-based synthetic vaccines. **Chemical Science**, v. 7, n. 2, p. 842–854, 2016.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.

TESTASICCA, M. C.; dos SANTOS M. S.; MACHADO, L. M.; SERUFO, A. V.; DORO, D.; AVELAR, D.; TIBÚRCIO, A. M.; ABRANTES, C. F.; MACHADO-COELHO, G. L.; GRIMALDI, G. Jr.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A.P. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 169-176, 2014.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Phylogenetic Taxonomy of New World Leishmania. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, n. 2, p. 104-106, 1993.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Recent Advances in Vaccines Against Leishmania Based on Patent Applications. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 21 – 32, 2017.

TOLEDO-MACHADO, C. M. et al. Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Mimotope Peptides Selected from Phage Displayed Combinatorial Libraries. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015a.

TOLEDO-MACHADO, C. M. et al. Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. **Parasites and vectors**, v. 8, n. 1, p. 133, 2015b.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000 Research**, v. 6, n. 750, 2017.

VILLARD, S.; LACROIX-DESMAZES, S.; KIEBER-EMMONS, T.; PIQUER, D.; GRAILLY, S.; BENHIDA, A. et al. Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 949-952, 2003.

WEI, X. Q.; CHARLES, I. G.; SMITH, A.; URE, J.; FENG, G.J.; HUANG, F. P.; XU, D.; MULLER, W. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, n. 375, p. 408–411, 1995.

WHO. Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance. **WHO Diagnostic Evaluation Series**, n. 4, 2010.

WHO. Global Leishmaniasis Surveillance Update, 1998-2016. **Weekly Epidemiological Record**, v. 40, p. 521-540, 2018.

WU, C. H.; LIU, I. J.; LU, R. M.; WU, H. C. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. **Journal of biomedical science**, v. 23, n. 8, 2016.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M, A, Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, n 54, 1994.

ZANETTE, M. F.; LIMA, V. M.; LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; VIEIRA, R. F.; BIONDO, A. W. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014.

ZANETTI, A. S. et al. Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-*Leishmania* antibodies in patients with American Tegumentary Leishmaniasis: a systematic review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 2019.