

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**WILQUER CASTRO LAURINDO**

Avaliação do potencial vacinal de derivados de duas proteínas de *Leishmania*  
*infantum* para aplicação no controle da leishmaniose visceral

Araraquara  
2021

**WILQUER CASTRO LAURINDO**

Avaliação do potencial vacinal de derivados de duas proteínas de *Leishmania infantum* para aplicação no controle da leishmaniose visceral

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Graminha

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Danielle Pedrolli

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

L384a Laurindo, Wilquer Castro  
Avaliação do potencial vacinal de derivados de duas proteínas de *Leishmania infantum* para aplicação no controle da leishmaniose visceral / Wilquer Castro Laurindo.  
– Araraquara : [s.n.], 2021  
97 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Márcia Aparecida Silva Graminha  
Coorientador: Danielle Biscaro Pedrolli

1. Doenças negligenciadas. 2. Peptídeos. 3. Vacinação.  
4. Imunização. 5. Tripanossomatídeo. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Avaliação do potencial vacinal de duas proteínas de  
*Leishmania infantum* para aplicação no controle da  
leishmaniose visceral”

**AUTOR: WILQUER CASTRO LAURINDO****ORIENTADORA: MÁRCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA****COORIENTADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela  
Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP Araraquara



Prof. Dr. PAULO LEE HO (Participação Virtual)  
Centro de Biotecnologia / Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo - Instituto  
Butantan - São Paulo



Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias - UNESP - Jaboticabal



Araraquara, 24 de setembro de 2021

## **DADOS CURRICULARES**

**Nome:** Wilquer Castro Laurindo

**Filiação:** José Anatólio Laurindo e Maria Aparecida Castro Laurindo

**Nascimento:** 19/01/1995 - Timóteo - MG

### **Endereço Profissional:**

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos (LabBioqBioMolTrip), Departamento de Análises Clínicas da FCF-UNESP.

Endereço: Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01, Campus Ville, S/N, Araraquara SP.

CEP: 14800-903

email: [w.laurindo@unesp.br](mailto:w.laurindo@unesp.br)

### **Formação Acadêmica:**

#### **2013 - 2018**

Graduação: Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei, Campus de Alto Paraopeba, Ouro Branco - MG.

#### **2019 - 2021**

Mestrado: Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia Celular e Molecular

Instituição: Instituto de Química (IQ) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara - SP.

Dissertação: Avaliação do potencial vacinal de derivados de duas proteínas de *Leishmania infantum* para aplicação no controle da leishmaniose visceral

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Graminha.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danielle Pedrolli

Bolsa: CAPES

### **Produção bibliográfica:**

#### **Trabalhos publicados em eventos:**

Clementino, L.C.C.; Teixeira, T.R., Santos, G. S.; Laurindo, W.C.; Deboni, H. M.; Colepicolo, P.; Graminha, M.A.S. Endophytic fungi of brown Antarctic macroalgae: Identification of antileishmanial metabolites and its possible molecular target. Apresentação oral no VII REDEALGAS Workshop, Biotechnology for Wellness. Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. 2019.

Laurindo, W.C.; Fuentes, D.L.P.; Pedrolli, D.B.; Graminha, M.A.S. Mapeamento de epítomos, in sílico, de uma proteína hipotética de *Leishmania infantum* para o desenvolvimento de uma vacina peptídica. Apresentação oral no I BiotecFarma. Araraquara, São Paulo. 2020.

**Participação em reuniões científicas e cursos de curta duração:**

Minicurso: Fundamentos de qPCR para análise de expressão gênica e quantificação de carga viral. 19 a 22 de maio. Ministrada pela Msc. Mariana Marchi Santoni Biasioli na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com carga horária de 30 horas. 2020.

Congresso Biotecnologia Brasil, 24 a 28 de agosto. Movimento Biotecnologia Brasil Evento Online com carga horária de 15 horas. 2020.

I Semana de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, 10 a 14 de agosto. Universidade Federal de Viçosa. Evento Online com carga horária de 10 horas. 2020.

Minicurso: Desenho de proteínas sintéticas aplicadas no diagnóstico imunológico, realizado durante a I Semana de Proteômica e Bioquímica de Proteínas. Universidade Federal de Viçosa. Evento Online com carga horária de 10 horas. 2020.

Minicurso: Sequenciamento de Sanger, 5 a 8 de abril. Ministrada pela Msc. Mariana Marchi Santoni Biasioli na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com carga horária de 8 horas. 2021.

Webinar Corporate Venture, 24 de junho. Agência de Inovação da Unicamp. Evento Online com carga horária de 2 horas. 2021.

Workshop Mecanismos Moleculares de Ação de Drogas Tripanocidas, 8 e 9 de setembro pelo Instituto Oswaldo Cruz. Evento Online com carga horária de 11 horas.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus por me dar forças para prosseguir minha jornada. Quero citar um hino da igreja que reflete o que eu sinto neste momento: “Cantarei quando a dor chegar, quando sorrir; Cantarei quando eu vacilar, cantarei só a ti; Cantarei pois me erguerás, com Tua mão”, só ele é capaz de me erguer, me por de pé seja no momento que for.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais por sempre me aconselhar, orientar e me apoiar em Tudo!

Ainda quero agradecer a mim mesmo, pois eu trabalhei... como trabalhei!! Eu olho para trás e não sei como consegui percorrer todo esse caminho, não foi fácil, mas eu consegui!

Agradeço à Professora Dr<sup>a</sup>. Márcia Graminha por ter me aceitado como aluno, um menino lá do interior de MG, do qual ela nunca havia ouvido falar. Agradeço por ter confiado este projeto a mim, por ter investido em mim, mas principalmente pelo incentivo e paciência ao longo desses dois anos e meio. Aprendi muito! E levarei todos os aprendizados sempre comigo.

Agradeço ao Dr. Deivys Leandro Portuondo Fuentes por ter tido a paciência durante todo o tempo que realizamos experimentos juntos, pelos ensinamentos e orientações, além, de me ensinar a realizar aplicação via subcutânea, já que eu “tinha” certo medo em manipular os camundongos.

Agradeço à Professora Dr<sup>a</sup> Danielle Pedrolli que conseguiu me passar muito conhecimento num curto período de tempo. Também por todo o investimento feito. Ainda, aos alunos da professora: Gabriela, Milca, Gracy, Nathan e Rafael, e ao Laboratório de Enzimologia do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Agradeço ao Professor Dr. Eduardo Maffud por gentilmente permitir que eu realizasse as sínteses em seu laboratório. Também por todo o investimento feito. Ainda, aos alunos do professor e ao Laboratório de Síntese e Estudos de Biomoléculas.

Agradeço à Mariana Marchi Santoni, Técnica do Laboratório de Análises Biomoleculares – Multiusuários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, pelos sequenciamentos realizados.

Agradeço ao João Luiz Bronzel Junior, Técnico do Núcleo de Bioensaios, Biosíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – Instituto de Química, Unesp pelas análises de espectrometria de massas.

Agradeço às minhas amigas: Raissa, Camila, Priscila e Tatiana que me aturam por vários anos! Elas que sempre me escutam reclamar ou falar de alguma série coreana mesmo que não assistam e que gostam de uma fofoca edificante. Além disso, muito importante, à Raissa por compartilhar do mesmo gosto por Reality Show, à Camila por discutir comigo teorias do universo Marvel (que a Raissa não aguenta mais ouvir falar), à Priscila que mesmo ocupada, sei que está sempre observando e à Tatiana pelas discussões sobre a vida dos famosos e pelas receitas compartilhadas.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF-UNESP: ao Leandro por ter me passado seu conhecimento de Biologia Molecular e ainda me aconselhar durante todos esses anos. À Natália por me ensinar a arte da síntese, sem você não conseguiria terminar esse projeto. À Michele por ter se disposto a me ajudar na determinação da carga parasitária e por ter se tornado minha amiga para toda hora. À Juliane por ser minha parceira de “biomol”, apesar de nossos projetos não serem correlatos, pelos conselhos e pela sinceridade. À Angela pelo conhecimento compartilhado e pelo investimento feito neste projeto. À Eduarda por ser quase uma irmã, “a irmã perdida em Araraquara”. À Maricely pelo carinho e preocupação, já que eu sou o próprio “irmão da Elsa”. À Alessandra que mesmo sendo “na dela” sempre foi carinhosa. E ao Gabriel, a.k.a. “a gata”, pela alegria contagiante. A todos pelo apoio, momentos de descontração e convívio

Agradeço às meninas da Limpeza: Rose, Andrea, Vitória e Samira. E às meninas da portaria do DAC: Rosemira e Viviane, por sempre nos receber com um sorriso no rosto e uma boa conversa para começar bem o dia;

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, assim como, aos funcionários deste Instituto de Química e da Seção Técnica de Pós Graduação: Wênia e Robson;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 88887.341829/2019-00;

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho: Processo nº 2017/03552-5, nº 2016/06931-4 e INCT 2014/50926-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo;

## RESUMO

A *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) é o principal agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas, sendo os cães reservatórios do parasita. Como casos caninos, geralmente, precedem casos humanos, é importante o controle da doença na população canina. Considerando que há poucas opções de controle, tanto por via terapêutica quanto por medidas sanitárias (combate ao vetor ou população canina afetada), é importante o desenvolvimento de novas drogas ou vacinas para um controle efetivo dessa parasitose. Duas proteínas hipotéticas de *L. infantum*, denominadas LC36 e LC06, anteriormente caracterizadas quanto às suas propriedades antigênicas pelo nosso grupo de pesquisa, foram alvos de estudo deste trabalho. Inicialmente, investiu-se na tentativa de produção destas proteínas nos sistemas de expressão heterólogos *Bacillus subtilis* ou *Escherichia coli*. Para isso, realizou-se a clonagem da ORF *lc36* em vetores de expressão adequados, como pBS0EXylRPxulA\_V2-[RFP] para indução da expressão em *B. subtilis* (KO7 e  $\Delta 6$ ) e pMAL-p5x para expressão, em *E. coli*, da proteína fusionada à "Proteína ligadora de maltose", com o intuito de diminuir problemas de solubilização. Devido às dificuldades experimentais, partiu-se para a síntese de peptídeos. Para LC36, após mapeamento *in silico* visando a predição de epítomos ligantes para linfócitos B, sintetizou-se com sucesso o peptídeo WC2025 e, para LC06, investiu-se na síntese do peptídeo EV0410, previamente caracterizado quanto às suas propriedades antigênicas. Estes peptídeos foram analisados em relação a sua capacidade de elicitar uma resposta humoral e proteção em camundongos BALB/c desafiados com o parasita *L. infantum*. Os peptídeos foram administrados por via subcutânea com três doses (dias 0, 14 e 21) da formulação vacinal, tendo como adjuvante a saponina. No 28º dia, metade dos animais foram eutanasiados para as análises de resposta humoral e o restante, infectados com *L. infantum*. Quinze dias após a infecção, determinou-se a carga parasitária destes animais. Verificou-se a presença, predominantemente, de IgG1 e, também, de IgG2a em menor nível. A carga parasitária nos animais que receberam a vacina foi, significativamente, menor que nos grupos controle, com redução de 37,8 % no fígado e 27,6 % no baço. Paralelamente, avaliou-se, em um ensaio de desafio, o potencial protetor do soro dos animais imunizados com os peptídeos (imunização passiva), sendo observada redução de ~40% na carga parasitária no fígado e no baço dos animais que receberam este soro. Esses resultados são promissores e abrem novas perspectivas de investigação destes peptídeos em outras formulações e a possibilidade de se explorar a via da imunoterapia.

**Palavras Chave:** Leishmaniose visceral; Peptídeos imunológicos; Vacina; Peptídeos sintéticos; Vacina peptídica.

## ABSTRACT

*Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) is the etiological agent of visceral leishmaniasis in the Americas, and dogs are reservoirs of the parasite. Since canine cases often precede human cases, it is important to control the disease in the canine population. Considering that there are few control options, either therapeutically or by sanitary and phytosanitary measures (vector's elimination or control of infected canine population), it is important to develop new drugs and vaccines for an effective control of this parasitic disease. Two *L. infantum* hypothetical proteins, LC36 and LC06, which were previously evaluated regarding their antigenicity properties were investigated about their potential immunogenicity. Initially, due to experimental difficulties to produce these two proteins using the heterologous expression systems *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, the strategy of peptide chemical synthesis was adopted. After in silico mapping of LC36 epitopes for B cells, a peptide, the WC2025, was successfully synthesized as well as the peptide EV0410 derived from LC06 that has its immunoreactivity against sera from *L. infantum* - infected dogs successfully demonstrated, was also synthesized. These peptides were investigated for their ability to elicit a humoral response and protection in BALB/c immunized mice, soon after challenged with *L. infantum* parasites. A combination of WC2025 and EV0410, and saponin as adjuvant, were subcutaneously administered (Days 0, 14 and 21). At day 28 post immunization, half of mice were euthanized and the collected sera analyzed for humoral response development, which was observed predominantly the presence of high levels IgG1 and low levels of IgG2a. The other group of animals were challenged with *L. infantum*. promastigotes and after fifteen days post-infection, parasite load determination in the liver and the spleen showed a significant parasite reduction in the immunized animal for both liver (37.8%) and spleen (27.6%). At the same time, the vaccinated animals' serum was inoculated in healthy mice and 48hs later, infected with *L. infantum*. It was observed a ~40% reduction in the parasite load in both liver and spleen. The results herein presented are original and open up new perspectives for the evaluation of new formulations containing these peptides combined or not with other epitopes as well as the use of other adjuvants to burst the immune response. It is also important to emphasize the new perspective to gain the path of immunotherapy considering the success of the passive immunization herein obtained.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis; Immune peptides; Vaccine; Synthetic peptides; Peptide-based vaccine.

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                    | <b>11</b> |
| <b>1.1 Leishmanioses</b>                               | <b>11</b> |
| <b>1.2 A resposta imune nas leishmanioses</b>          | <b>13</b> |
| <b>1.3 Vacinas e leishmaniose</b>                      | <b>14</b> |
| <b>1.4 Vacinas de peptídeos</b>                        | <b>17</b> |
| <b>1.5 Vacinas para cães</b>                           | <b>19</b> |
| <b>2 OBJETIVO</b>                                      | <b>20</b> |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>                            | <b>21</b> |
| <b>3.1 Animais</b>                                     | <b>21</b> |
| <b>3.2 Linhagens de <i>L. infantum</i></b>             | <b>21</b> |
| <b>3.3 Linhagens de bactérias</b>                      | <b>21</b> |
| <b>3.4 Meios de cultura</b>                            | <b>22</b> |
| <b>3.5 Sequências</b>                                  | <b>23</b> |
| <b>3.6 Extração de DNA genômico (gDNA)</b>             | <b>23</b> |
| <b>3.7 Amplificação de DNA</b>                         | <b>23</b> |
| <b>3.8 Manipulação de DNA</b>                          | <b>25</b> |
| <b>3.9 Transformação bacteriana</b>                    | <b>25</b> |
| <b>3.10 Extração de DNA plasmidial (pDNA)</b>          | <b>26</b> |
| <b>3.11 Sequenciamento</b>                             | <b>27</b> |
| <b>3.12 PCR de colônia</b>                             | <b>27</b> |
| <b>3.13 Expressão de proteínas recombinantes</b>       | <b>27</b> |
| <b>3.14 Extração de proteína</b>                       | <b>27</b> |
| <b>3.15 Western Blot</b>                               | <b>28</b> |
| <b>3.16 Obtenção do EV0410 para clonagem</b>           | <b>28</b> |
| <b>3.17 Predição de epítomos para células B</b>        | <b>29</b> |
| <b>3.18 Síntese de peptídeos</b>                       | <b>29</b> |
| <b>3.19 Reação de clivagem dos peptídeos</b>           | <b>30</b> |
| <b>3.20 Purificação e caracterização dos peptídeos</b> | <b>30</b> |
| <b>3.21 Ensaio de Imunização e Imunoproteção</b>       | <b>31</b> |
| <b>3.22 Obtenção do soro dos camundongos</b>           | <b>31</b> |
| <b>3.23 Imunização passiva</b>                         | <b>31</b> |
| <b>3.24 Resposta humoral</b>                           | <b>32</b> |
| <b>3.25 Quantificação da cara parasitária</b>          | <b>32</b> |

|                                                                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.26 Análise estatística                                                                                                                            | 33        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                                     | <b>33</b> |
| 4.1 Um fragmento de 2396pb contendo toda a ORF <i>lc36</i> foi clonada no vetor pBS0EXylRPxylA_V2                                                   | 34        |
| 4.2 A fusão de Maltose Binding Protein na porção amino terminal da LC36 não contribuiu para sua expressão em <i>E coli</i> ou em <i>B. subtilis</i> | 39        |
| 4.3 Fragmento de 774pb da ORF <i>lc36</i> foi clonada em pMAL-p5x para expressão em <i>E. coli</i>                                                  | 46        |
| 4.4 Ampliação ORF <i>lc06</i> para clonagem e expressão nos sistemas heterólogos <i>B. subtilis</i> e <i>E. coli</i>                                | 49        |
| 4.5 Mapeamento e síntese em fase sólida de peptídeos ligantes de linfócitos B                                                                       | 52        |
| 4.6 Imunização de camundongos BALB/c com uma mistura dos peptídeos EV0410 e WC2025                                                                  | 61        |
| 4.6.1 Resposta humoral                                                                                                                              | 62        |
| 4.6.2 Carga Parasitária                                                                                                                             | 67        |
| 4.7 Imunização passiva                                                                                                                              | 70        |
| <b>5 CONCLUSÃO</b>                                                                                                                                  | <b>71</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                                                 | <b>72</b> |
| <b>ANEXO</b>                                                                                                                                        | <b>87</b> |
| <b>APÊNDICE A — Aprovação do comitê de Ética</b>                                                                                                    | <b>97</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmanioses

Endêmica em 98 países, sobretudo, nas regiões tropicais e subtropicais do globo, as leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por pelo menos vinte espécies diferentes de *Leishmania* (ALVAR; VELEZ; BERN; HERRERO *et al.*, 2012; ORGANIZATION, 2010). Por afetar, principalmente, pessoas de baixo nível socioeconômico e consequentemente, atrair poucos investimentos do setor farmacêutico, além de não ser politicamente reconhecida e priorizada, essa parasitose tornou-se um fardo para a saúde mundial (JAIN; JAIN, 2015; MONGUI; PÉREZ-LLANOS; YAMAMOTO; LOZANO *et al.*, 2015).

A disseminação da doença ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo, popularmente conhecido como mosquito palha, para o desenvolvimento dos ovos (KILLICK-KENDRICK, 1999). Neste processo, formas promastigotas presentes no tubo digestivo do inseto são inoculadas no local da picada. Estes parasitas são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente os macrófagos, onde ocorre a diferenciação em amastigotas (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; SRIVASTAVA; SHANKAR; MISHRA; SINGH, 2016).

O tipo de manifestação clínica é consequência de diferentes fatores, como o grau de patogenicidade e infectividade da espécie; e genética, idade e resposta imune do hospedeiro mamífero (MURRAY; BERMAN; DAVIES; SARAVIA, 2005). Por outro lado, existem indivíduos que, naturalmente, apresentam resistência à infecção por *Leishmania* spp. e não apresentam sintomas (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Há três formas predominantes da doença: a mais comum é a leishmaniose cutânea (LC), manifestada pela formação de lesões na pele; a leishmaniose mucocutânea (LMC), que afeta as regiões de mucosa; e a leishmaniose visceral (LV), forma mais grave da doença, caracterizada por febre, anemia e hepatoesplenomegalia (aumento demasiado do fígado e baço), que pode ser fatal se não tratada (HAILU; DAGNE; BOELAERT, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2021a), estima-se que o número de novos casos da LV esteja entre 50.000 e 90.000 por ano. A baixa disponibilidade de fármacos, elevada toxicidade e eficácia reduzida, torna o tratamento longe de ser o ideal (LAMOTTE; SPATH; RACHIDI; PRINA, 2017). Em 2019, 90% dos casos de LV relatados no mundo ocorreram em dez países, incluindo o Brasil (ORGANIZATION, 2021b). Além

disso,, Segundo o Informe Epidemiológico das Américas (2020), de todos os casos relatados na América Latina, 97 % deles ocorreram no Brasil. A doença, anteriormente considerada como tipicamente rural, agora passa por um processo de urbanização causado por grandes desmatamentos e migrações humanas (CARNEIRO CASTRO COSTA; MORALEJO BERMUDI; COLEBRUSCO RODAS; NUNES *et al.*, 2018).

Além das contribuições humanas para a propagação e urbanização da doença, ainda é importante considerar o papel epidemiológico dos cães na cadeia de transmissão da LV, em que os cães domésticos apresentam-se como reservatórios do parasita, tanto nas áreas urbanas como nas periurbanas (SOLANO-GALLEGO; CARDOSO; PENNISI; PETERSEN *et al.*, 2017). Assim como em humanos, a infecção em cães por *Leishmania* não obrigatoriamente levará ao aparecimento de sintomas, pois esses animais podem permanecer assintomáticos por longos períodos de tempo ou nunca apresentar sinais clínicos (SOLANO-GALLEGO; MIRÓ; KOUTINAS; CARDOSO *et al.*, 2011). Segundo Esteva *et al.* (2017), um em cada cinco cães infectados, nas regiões endêmicas, não manifestam a doença, além de existirem coinfeções que mascaram os sintomas da LV nesses animais, dificultando o diagnóstico (CHIN, 2000) e, conseqüentemente, o controle da doença. Desta forma, a OMS, entre outras ações, preconiza o uso de profilaxia nos animais como medida de proteção contra a doença. (ORGANIZATION, 1982).

Como medidas de controle, no Brasil, o Ministério da Saúde destaca o diagnóstico, o tratamento precoce dos indivíduos doentes, bem como o uso de coleiras impregnadas com inseticidas em cães e, finalmente, o combate ao vetor. Entretanto a efetividade destas ações é ainda limitada (CARNEIRO CASTRO COSTA; MORALEJO BERMUDI; COLEBRUSCO RODAS; NUNES *et al.*, 2018). Para o tratamento de cães no Brasil, apenas em 2016 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento autorizou o uso da miltefosina, algo que já é feito na Europa desde 2002. O uso da eutanásia, porém, ainda é recomendado, principalmente, para os animais de rua, pelo bem estar do animal, e dependendo das condições financeiras do dono para a realização do tratamento (BRASIL, 2016; COSTA; CODEÇO; BERMUDI; RODAS *et al.*, 2020; DOS SANTOS NOGUEIRA; AVINO; GALVIS-OVALLOS; PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2019), o qual apresenta custo elevado, podendo alcançar o valor médio de R\$ 2000,00 (tratamento completo), considerando um animal de médio porte (30 a 40kg).

Desta forma, tendo em mente que a doença acomete, principalmente, pessoas de baixa renda e as dificuldades inerentes ao próprio tratamento, a vacinação torna-se

mais uma alternativa essencial para o combate à doença, o que pode ser estendido aos cães como uma forma mais econômica de controle da infecção na população canina, conseqüentemente, diminuindo a dispersão da doença na população humana. Para isso, é importante conhecer os aspectos imunológicos da infecção para o desenvolvimento de vacinas.

## 1.2 A resposta imune nas leishmanioses

Em infecções causadas por *Leishmania*, para que um hospedeiro seja capaz de resolver a infecção, é necessário que ele consiga ativar tanto o sistema imune inato quanto o adquirido. Embora o primeiro seja o agente efetor da ação leishmanicida, é por meio do estímulo do segundo que ele consegue ser ativado (SHARMA; SINGH, 2009; TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2005). A resposta imune baseada em linfócitos Th1 é considerada necessária para se combater as leishmanioses, pois essas células produzem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 que auxiliam na ativação de macrófagos. Belosevic *et al.* (1989) conseguiram transformar camundongos, inicialmente resistentes à infecção, em animais susceptíveis pela neutralização do IFN- $\gamma$  com anticorpos. O mesmo foi observado ao inativar o gene codificador do IFN- $\gamma$ , favorecendo o desenvolvimento de resposta Th2 em camundongos (WANG; REINER; ZHENG; DALTON *et al.*, 1994), tornando-os susceptíveis à infecção via produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Analisando a progressão da infecção por *L. major* em BALB/c, Locksley *et al.* (1987) observaram a produção de IL-4, enquanto C57BL/6 apresentou produção de IFN- $\gamma$ , mas não IL-4, o que segundo os autores justificaria a resistência à infecção por esse animal. Outros autores demonstraram que a diferença de susceptibilidade entre estas duas linhagens de camundongos estão ligadas à produção de IL-12 pelas células dendríticas e à reatividade das células T à essa citocina. Enquanto em BALB/c a produção de IL-12 é menor, além de apresentar linfócitos T pouco responsivos a ela, o oposto é observado na linhagem resistente C57BL/6 (HIMMELRICH; PARRA-LOPEZ; TACCHINI-COTTIER; LOUIS *et al.*, 1998; LOUIS; HIMMELRICH; PARRA-LOPEZ; TACCHINI-COTTIER *et al.*, 1998; LOUIS; CONCEIÇÃO-SILVA; HIMMELRICH; TACCHINI-COTTIER *et al.*, 1998).

A citocina IL-10, identificada em amostras de pacientes com LV ativa (BELKAID; HOFFMANN; MENDEZ; KAMHAWI *et al.*, 2001; GOTO; LINDOSO, 2004; MURPHY; WILLE; VILLEGAS; HUNTER *et al.*, 2001), apresenta como mecanismo de ação a supressão da produção de IFN- $\gamma$ , favorecendo a resposta Th2 e, conseqüentemente, o parasita

numa batalha injusta (GHALIB; WHITTLE; KUBIN; HASHIM *et al.*, 1995; NYLÉN; MAURYA; EIDSMO; MANANDHAR *et al.*, 2007).

Apesar de o curso da infecção, geralmente, recair sobre os linfócitos T auxiliares (CD4+), os linfócitos T citotóxicos (CD8+) também podem ter participação neste processo (HOLADAY; SADICK; WANG; REINER *et al.*, 1991; NYLÉN; GAUTAM, 2010), como descrito por Belkaid *et al.* (2002) e Stern *et al.* (1988), que também demonstraram a participação de células CD8+ no controle tanto da LC quanto da LV. Tsagozis *et al.* (2003) identificaram uma ação dual dos linfócitos CD8+ em modelo experimental de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*, os quais atuaram tanto produzindo citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quanto elevando a atividade citotóxica.

Quanto aos linfócitos B, sua atuação está ligada à interação com os linfócitos T auxiliares, agindo como células apresentadoras de antígeno nos estágios iniciais da resposta imune, como mecanismo facilitador da sua própria ativação e diferenciação. Dessa forma, essa interação contribui para a produção de citocinas e outros fatores que facilitam a polarização para a resposta Th1 ou Th2 (CRAWFORD; MACLEOD; SCHUMACHER; CORLETT *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-PINTO, 2005). No entanto, apesar de alguns autores afirmarem que o papel dos anticorpos na proteção contra leishmaniose ainda não é certo (BROWN; REINER, 1999; CALDAS; FAVALI; AQUINO; VINHAS *et al.*, 2005; DEAK; JAYAKUMAR; CHO; GOLDSMITH-PESTANA *et al.*, 2010), sua participação na proteção não pode ser excluída, já que pessoas soropositivas e moradoras de áreas endêmicas são mais resistentes para desenvolver a doença novamente (COSTA; STEWART; GOMES; GARCEZ *et al.*, 2002). De fato, em um estudo desenvolvido em Bihar, na Índia, de um grupo de 33% de pessoas soropositivas para LV, apenas 3,5% desenvolveram a doença (OSTYN; GIDWANI; KHANAL; PICADO *et al.*, 2011). Além disso, Scott (1986) e Woelbing (2006) observaram o favorecimento da leishmaniose cutânea, causada por *L. major*, ao tratar animais resistentes C3H/HeN e C57BL/6 com anticorpos anti-IgM e pela deleção do gene para cadeia pesada dos anticorpos. Ambos observaram a dependência dos linfócitos T das células B para ativação, havendo, inclusive, redução na produção de IFN- $\gamma$ .

### 1.3 Vacinas e leishmaniose

A vacinação visa a redução da morbimortalidade de doenças e ajuda na diminuição da circulação de patógenos, consequentemente, é uma ferramenta muito eficaz para o controle de doenças (BARBIERI; COUTO; AITH, 2017). Ao se tratar das leishmanioses, as

pesquisas com vacinas se fundamentam na proteção contra a reinfeção após a resolução da infecção (ALVAR; CROFT; KAYE; KHAMESIPOUR *et al.*, 2013; BEAUMIER; GILLESPIE; HOTEZ; BOTTAZZI, 2013). Desta forma, por anos, diversas pesquisas foram conduzidas com o propósito de desenvolver uma vacina capaz de apresentar proteção contra a infecção por *Leishmania*.

A primeira geração de vacinas envolveu o uso de *Leishmania* viva e virulenta na formulação. Essas metodologias, conhecidas como leishmunização, são datadas desde 1911 e foram utilizadas por mais de 60 anos (SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014). A leishmunização foi abandonada ao longo dos anos para dar espaço a outras formas de imunização mais seguras. O uso de patógenos atenuados foi, a seguir, outra estratégia adotada. Essa atenuação pode ser realizada via ação física (temperatura e irradiação), química (compostos mutagênicos, antibiótico) ou genética (cultivo por longas passagens ou manipulação genética), enquanto a obtenção do patógeno morto, por autoclavagem, pasteurização ou rompimento por merthiolate ou fenol (NAGILL; KAUR, 2011; SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014).

Bruhn *et al.* (2012) utilizaram *L. infantum* atenuada por processos físicos para imunizar camundongos, os quais mostraram-se parcialmente protegidos contra posterior desafio. Resultado semelhante foi observado por Anand & Madhubada (2015) ao modificar, geneticamente, *L. donovani*, tornando-a deficiente para a enzima arabino-1,4-lactone oxidase ligada à síntese de ácido ascórbico. Os animais imunizados e, posteriormente, desafiados, apresentaram redução significativa na carga parasitária (90%) e produziram uma resposta Th1.

Fiuza *et al.* (2015) ), por uma abordagem genética, deletou o gene da centrina de *L. donovani* e demonstrou as propriedades imunogênicas desta cepa em Beagles, os quais produziram citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  associadas a elevados níveis de IgG2a. É interessante destacar que Zhang e colaboradores (2020) geraram uma linhagem de *L. major* também geneticamente modificada para o gene da centrina, porém, utilizando a ferramenta de edição gênica CRISPR-CAS9 para produzir células nocauteadas sem carregar marcadores de resistência a drogas comuns neste tipo de abordagem, possibilitando a aplicação futura desta estratégia de leishmanização em ensaios clínicos em humanos.

Já as vacinas de segunda geração, compreendem frações purificadas de extrato de *Leishmania* ou subunidades do parasita, podendo ser peptídeos/proteínas recombinantes ou sintéticos (DAS; ALI, 2012). A aplicação da tecnologia do DNA recombinante permitiu superar problemas de segurança relacionados às vacinas de primeira

geração (virulência em hospedeiros susceptíveis e a reversão da atenuação) (NASCIMENTO; LEITE, 2012), assim como a possibilidade de trabalhar com uma ou mais proteínas expressas nos estágios dos patógenos relevantes para o desenvolvimento da infecção (JOSHI; RAWAT; YADAV; KUMAR *et al.*, 2014).

O primeiro antígeno recombinante testado foi a glicoproteína GP63, altamente conservada entre as diferentes espécies de *Leishmania*, a qual gerou um efeito protetor tanto para LV quanto para LC quando utilizada em sua forma nativa. Entretanto, a sua forma recombinante produzida em *Escherichia coli* não foi capaz de gerar a mesma resposta (BHOWMICK; RAVINDRAN; ALI, 2008; HANDMAN; BUTTON; MCMASTER, 1990; KAHL; LELCHUK; SCOTT; BEESLEY, 1990), embora estudos posteriores mostraram resultados mais promissores com a forma recombinante da GP63, obtidos pela mudança na via de administração do antígeno e do adjuvante utilizado (ABDELHAK; LOUZIR; TIMM; BLEL *et al.*, 1995; JAAFARI; BADIEE; KHAMESIPOUR; SAMIEI *et al.*, 2007; JAAFARI; GHAFARIAN; FARROKH-GISOOR; SAMIEI *et al.*, 2006; MAZUMDER; MAJI; DAS; ALI, 2011).

Kumar *et al.* (2010) testaram as proteínas KPM11, A2, CPB, K26/HASPB, NH e SMT de *L. infantum* como alvo vacinal. Das seis proteínas, apenas A2 e KPM11 tiveram baixa eficiência na redução da carga parasitária em camundongos, apesar de a proteína A2 ter sido capaz de estimular a produção de IFN- $\gamma$ . A proteína A2 presente no retículo endoplasmático de várias espécies de *Leishmania* é alvo de estudo desde o início dos anos 2000 (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2010). Oliveira *et al.* (2011) também mostraram a presença de outros alelos deste gene. Ghosh *et al.* (2001) e Celho *et al.* (2003) demonstraram a capacidade da A2 em induzir resposta Th1 para o controle de infecções causadas por *L. donovani* ou *L. amazonensis*, assim como a produção de IFN- $\gamma$  e resposta humoral consistente. No Brasil, estudos com a A2 foram realizados por Fernandes *et al.* (2008) ao investigar a imunogenicidade desta proteína, usando saponina como adjuvante no controle da LV. Tal trabalho resultou na vacina Leish-Tec®, que provou ter aumento na produção de IFN- $\gamma$  em cães e redução de IL-10 (FERNANDES; COELHO; MACHADO-COELHO; GRIMALDI *et al.*, 2012).

Maroof *et al.* (2012) propuseram o desenvolvimento de uma vacina para LV, usando com sucesso adenovírus como vetor para "delivery" de fragmentos das proteínas KMP11 e HASPB, sendo esta última associada à produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10. Posteriormente, Cecílio *et al.* (2017) estimularam células da medula óssea de pacientes de

regiões endêmicas para LV com infecção ativa ou curados com as proteínas KMP11 e LeishF3, verificando maior produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 após o estímulo com KMP11. Entretanto, após imunização de BALB/c com essas proteínas, houve resposta imune apenas contra a proteína LeishF3, não havendo produção de anticorpos contra KMP11, demonstrando que, apesar de ser reconhecida por células que já estiveram em contato com *Leishmania*, a proteína por si só não é capaz de elicitar uma resposta imunológica eficaz. Sendo assim, torna-se importante buscar alternativas, como outros adjuvantes para impulsionar a resposta imune.

Ainda dentro da segunda geração de vacinas, há a estratégia da imunoproteômica em identificar novas proteínas, cuja função e características ainda não foram estudadas (proteínas hipotéticas), como possíveis antígenos vacinais (COELHO; OLIVEIRA; VALADARES; CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2012). Lage *et al.* (2016) utilizaram proteína hipotética específica de *L. infantum* (LiHyD) na imunização de camundongos BALB/c tendo como adjuvante saponina de *Quillaja saponária*. Os animais imunizados apresentaram resposta Th1, com aumento na produção de IFN- $\gamma$  e IL-12, mas baixos níveis de IL-4 e IL-10. Para a avaliação da proteção cruzada, os animais foram desafiados com *L. braziliensis* e *L. major*, apresentando redução significativa da carga parasitária para as duas infecções, além de redução no inchaço na pata destes. Curiosamente, Duarte *et al.* (2016) realizou o contrário e avaliou a capacidade de proteção cruzada das proteínas de *L. brasiliensis* contra a infecção por *L. infantum*. A proteína EiF5a e a proteína hipotética de *L. brasiliensis*, LbHyp, foram expressas purificadas e usadas como antígenos em BALB/c, tendo saponina como adjuvante. Observaram-se a polarização da resposta para Th1 com produção maior de IgG2a que IgG1 e aumento na expressão de IL-12 e IFN- $\gamma$ . Ainda, os grupos imunizados com a combinação das proteínas apresentaram carga parasitária menor que aqueles que receberam apenas uma proteína.

Martins *et al.* (2017) construíram uma proteína recombinante quimérica a partir de epítomos de proteínas LiHyp1, LiHyp6, HRF e LiHyV, anteriormente avaliadas quanto à imunogenicidade e que apresentaram capacidade protetora em camundongos. A quimera causou redução na carga parasitária dos animais imunizados, aumento das citocinas Th1, IL-12, IFN- $\gamma$ , supressão de IL-4 e IL-10 e significativa presença de IgG2a tanto antes quanto após o desafio.

#### 1.4 Vacina de peptídeos

A vacinologia reversa é uma técnica que associa biologia molecular e bioinformática para fazer previsões com modelos matemáticos e computacionais, além de

possibilitar o desenvolvimento mais estratégico de vacinas, pois a seleção *in silico* permite identificar, diretamente, epítomos que são mais prováveis de desenvolver resposta protetora e consequente exclusão de sequências desnecessárias (MOXON; RECHE; RAPPUOLI, 2019). As principais vantagens dessa estratégia são sensibilidade, não necessidade de cultivo do patógeno e identificação de qualquer antígeno independentemente da quantidade de material para testes vacinais (DALSASS; BROZZI; MEDINI; RAPPUOLI, 2019).

Desta forma, a síntese química de peptídeo torna-se uma ferramenta facilitadora na produção de porções proteicas mínimas. Ela se baseia na formação da ligação peptídica entre o grupo amino e carboxílico de dois aminoácidos permitindo a extensão da sequência por processos repetitivos (MERRIFIELD, 1963). Relatada desde 1903 por Emil Fischer, a síntese química de peptídeo evoluiu, tornando-se vantajosa pelo baixo custo no escalonamento da produção, pela boa reprodutibilidade rapidez, principalmente, através da técnica de síntese em fase sólida, e pela automatização do processo (FISCHER; OTTO, 1903; JOSHI; RAWAT; YADAV; KUMAR *et al.*, 2014; MERRIFIELD, 1963; SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016).

Quanto às vacinas peptídicas, por serem quimicamente produzidas, os peptídeos podem ser totalmente caracterizados. Assim como uma droga química comum, são, geralmente, solúveis em água, estáveis em condições de armazenamento simples e a estabilidade e pureza podem ser conferidas via técnicas analíticas. Além disso, problemas associados a contaminantes biológicos são removidos, são menos prováveis a induzir respostas alérgicas ou doenças autoimunes, assim como não há risco de integração genética ou recombinação (problema enfrentado por vacinas de DNA) (PURCELL; MCCLUSKEY; ROSSJOHN, 2007; SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016).

Vijayamahantesh *et al.* (2017) investigaram a produção de IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10 por PBMC em resposta ao estímulo de cinco imuno-peptídeos selecionados *in silico* e derivados da enzima 3'-Nucleotidase de *L. infantum*. Estes foram capazes de estimular a produção de IL-12, IL-2 e IFN- $\gamma$  nas células e de aumentar a proliferação dos linfócitos T. Outros estudos valeram-se de trabalhos prévios de proteínas já caracterizadas quanto as suas propriedades imunogênicas. De fato, Agallou *et al.* (2014) identificaram peptídeos derivados de KMP-11, H1, CPA e LeIF, mostrando a capacidade de gerar a proliferação das células do baço, assim como induzir o aumento de IFN- $\gamma$ .

## 1.5 Vacinas para cães

Até 2020, quatro vacinas para cães eram comercializadas no mundo, sendo duas no Brasil (Leishmune® e Leish-Tec®) e duas na Europa (CaniLeish® e LetiFend®). No entanto, a eficiência dessas vacinas continua em análise apesar da comercialização (VELEZ; GALLEGO, 2020). Dentre as vacinas comercializadas no Brasil, a Leishmune®, licenciada em 2004, produzida pela Zoetis, foi retirada do mercado 10 anos após aprovação pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) devido à insuficiência nos dados obtidos pela fase III do estudo clínico, não atendendo aos requisitos da Instrução Normativa Interministerial nº 31 de 09 de julho de 2007 (MAPA, 2019). A vacina Leishmune® possuía em sua formulação a glicoproteína FML (ligante de fucose manose), isolada de *L. donovani*, que está presente na superfície da *Leishmania* durante o ciclo celular, além de saponina como adjuvante (DANTAS-TORRES, 2006).

A segunda, Leish-Tec®, licenciada em 2007, produzida pelo laboratório Ceva, é atualmente a única vacina disponível para cães na prevenção da LV, composta da proteína recombinante A2 de *L. donovani* e saponina como adjuvante. Apesar de já estar no mercado, não apresentou eficácia adequada quando avaliada em estudos de campo, implicando na não redução da doença em áreas endêmicas (GRIMALDI; TEVA; DOS-SANTOS; SANTOS *et al.*, 2017; VELEZ; GALLEGO, 2020).

Deste modo, diante dos resultados pouco conclusivos sobre a resposta imune protetora das diferentes vacinas de primeira ou segunda gerações apresentadas acima, verifica-se a necessidade de continuar a busca por antígenos capazes de, efetivamente, controlar a doença no hospedeiro mamífero, ao mesmo tempo em que possa atuar como bloqueador da transmissão do reservatório mamífero para o flebotomíneo. Isto posto, este trabalho visa avaliar peptídeos originados de duas proteínas hipotéticas de *L. infantum* como candidatos à vacina contra a LV, a proteína LC36 (LINF\_360049000) e a LC06 (LINF\_220009200), cujas características de antigenicidade foram demonstradas, anteriormente, por estudos conduzidos em nosso laboratório (LIMA, 2015b; NOGUEIRA; DEL CISTIA; URBACZEK; JUSI *et al.*, 2018).

A análise *in silico* baseada no banco de dados Bcipep (SAHA; RAGHAVA, 2006) indicou, como potencial epítopo para células B, uma região contendo os primeiros 256 aminoácidos da proteína LC36, a qual foi expressa em *E. coli* fusionada a uma cauda de histidina. Apesar da baixa solubilidade da proteína, o que afetou negativamente o rendimento da proteína expressa em *E. coli*, Nogueira *et al.* (2018) demonstraram a

imunorreatividade deste epítopo em ensaios de ELISA utilizando soro de cães positivos para LV, mostrando boa performance para aplicação no diagnóstico de LV canina (85% de sensibilidade e 71% de especificidade).

A proteína LC06 apresenta repetições *em tandem*, geralmente associadas como alvos de reconhecimento para resposta imune produzida pelos linfócitos B (GOTO; COLER; GUDERIAN; MOHAMATH *et al.*, 2006). Lima (2015), durante o desenvolvimento de seu trabalho de conclusão de curso, utilizou a estratégia de síntese química, visando a obtenção da proteína para os testes de imunorreatividade frente a soros de cães positivos para LV, ao invés de utilizar sistemas de expressão heterólogos, visto que as repetições presentes em LC06 (183 nucleotídeos que se repetem 31 vezes na sequência) dificultaram a etapa de amplificação do gene. Foi obtida, com sucesso, a síntese de dois peptídeos com 20 e 30 resíduos, os quais apresentaram-se imunorreativos em testes de ELISA frente a soros de cães positivos para LV.

## 2 OBJETIVO

Avaliação do potencial imunogênico e protetor das proteínas LC36 e LC06 de *L. infantum* em estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de uma vacina para controle da leishmaniose visceral.

### Os objetivos específicos do projeto são:

- Avaliar estratégias de expressão para produção das proteínas recombinantes LC36 e LC06:
  - Amplificar e clonar LC36 e LC06 no vetor pMAL-p5x para expressão em fusão com proteína *Maltose Binding Protein* (MBP) em *E. coli*;
  - Amplificar e clonar LC36 e LC06, fusionada ou não à MBP, no vetor pBS0EXylRPxylA\_V2 para expressão em diferentes linhagens de *B. subtilis*;
- Síntese química de peptídeos derivados de LC36 e LC06;
  - LC06: síntese do peptídeo EV0410;
  - LC36: mapeamento e seleção de epítomos para síntese de peptídeos derivados da proteína LC36;
- Identificação e seleção de peptídeos imunogênicos;

- Avaliação do potencial imunogênico e protetor de antígenos derivados de LC36 e LC06 utilizando o modelo experimental BALB/c;
  - Imunização de camundongos com os peptídeos derivados de LC36 e LC06;
  - Determinação de níveis de IgG específicos e subclasses IgG1 e IgG2a;
  - Infecção dos camundongos imunizados para realização de ensaio de desafio;
  - Determinação da carga parasitária.
  
- Avaliação do potencial protetor de anticorpos murino contra *L. infantum*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, com cinco a seis semanas de idade, obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação na Área de Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB), UNICAMP, Campinas, São Paulo. Grupos de cinco animais foram mantidos em caixas individuais, em grupos de cinco, em condições ambientais estáveis ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura e 56% de umidade relativa do ar) e ciclos claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram oferecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (CEUA/FCF/CAr n° 19/2020).

#### 3.2 Linhagens de *L. infantum*

Foram utilizadas as cepas de *L. infantum* MHOM/BR/1972/LD e MHOM/MA67ITMAP263, gentilmente cedidas pelos Drs. José Angelo Lindoso (Instituto de Medicina Tropical, USP) e André Gustavo Tempone Cardoso (Instituto Adolfo Lutz) e mantidas no Laboratório de Bioquímica e Biologia molecular de Tripanossomatídeos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara.

#### 3.3 Linhagens de bactérias

As linhagens e os genótipos de *E. coli* e *B. subtilis* utilizadas neste estudo estão descritas no quadro abaixo:

Quadro 1— Linhagens e genótipos de bactérias. Fonte: Elaborada pelo autor

| <b>Linhagem</b>                | <b>Genótipo</b>                                                                                           | <b>Referência</b>                          |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> TOP10           | hsdR, mcRA, lacZΔM15, endA1, recA1                                                                        | * <i>E. coli</i> genotypes- Open Wet Ware. |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)       | B F <sup>-</sup> dcmompThsdS(rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) galλ(DE3)                                  |                                            |
| <i>E. coli</i> BL21 Codon Plus | F <sup>-</sup> ompThsdS (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> TetrgalendAHte [argUproLCamr] |                                            |
| <i>E. coli</i> Rosetta         | F- ompThsdSB(RB- mB-) gal dcmλ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Camr)               |                                            |
| <i>B. subtilis</i> KO7         | ΔnprE ΔaprE Δepr Δmpr ΔnprB Δvpr Δbpr                                                                     | Dr. Zeigler, Bacillus Genetic Stock Center |
| <i>B. subtilis</i> Δ6          | trpC2 ΔSPβ Δskin ΔPBSX Δproφ1 Δpks::CmR, Δproφ3                                                           | Westers (2003)                             |

\* [https://openwetware.org/wiki/E.\\_coli\\_genotypes](https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes)

### 3.4 Meios de cultura

Schneider completo (Sigma-Aldrich) pH 6,9; suplementado com bicarbonato de sódio 4,7 mmol.L<sup>-1</sup>; cloreto de cálcio hidratado 5,5 mmol.L<sup>-1</sup>; tampão Hepes 5 mmol.L<sup>-1</sup>; Soro fetal bovino 10%; gentamicina 10 mg.mL<sup>-1</sup>; estreptomicina 100 µg.mL<sup>-1</sup>, penicilina 100 U.mL<sup>-1</sup>. Filtrado em membrana de 0,22 µm (Kasvi®) e armazenado a 4°C.

LB (Luria Bertani) pH 7,5; Triptona 10 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>; e NaCl 5 g.L<sup>-1</sup>; quando necessário meio sólido, adição de ágar 15g.L<sup>-1</sup>. O meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos. Quando necessário, antibióticos foram acrescentados de acordo com a requisição dos protocolos de transformação bacteriana.

RPMI completo (Roswell Park Memorial Institute medium)(Gibco®) pH 7,2; bicarbonato de sódio 23,8 mmol.L<sup>-1</sup>; tampão Hepes 9,9 mmol.L<sup>-1</sup>; Soro fetal bovino 10%; estreptomicina 100 µg.mL<sup>-1</sup>, penicilina 100 U.mL<sup>-1</sup>. Filtrado em membrana de 0,22 µm (Kasvi®).

SpII+EGTA pH 7,2; 200 mL de T base  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  18,3 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6 g.L<sup>-1</sup>, citrato de sódio  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 g.L<sup>-1</sup>), glicose 50% (m/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1,2% (m/v), Extrato de levedura 10% (m/v), *casamino acids* 1% (m/v) e EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>.

### 3.5 Sequências

As sequências completas de nucleotídeos e de aminoácidos referentes as ORFs hipotéticas *lc36* (número de acesso LINF\_360049000) e *lc06* (número de acesso LINF\_220009200) (Anexo) foram obtidas da base de dados TriTrypDB, *Kinetoplastid Genomics Resource* (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>), acesso em 03 de julho de 2020.

### 3.6 Extração de DNA genômico (gDNA)

DNA genômico (gDNA) de *L. infantum* foi extraído utilizando o kit de extração de DNA genômico Invitrogen™ PureLink™, de acordo com as recomendações do fabricante, seguido de quantificação em espectrofotômetro NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e mantido a 4°C até o momento do uso.

### 3.7 Amplificação de DNA

Para amplificação de DNA, a composição do mix para reação de PCR foi 500 ng de gDNA; tampão Taq DNA polimerase 1X; dNTP 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>; oligonucleotídeos iniciadores 0,5 μmol.L<sup>-1</sup> (tabela 2);  $\text{MgCl}_2$  1,5 mmol.L<sup>-1</sup> e Taq DNA Polimerase High Fidelity 1,25 U (Cellco Biotecnologia®), seguindo o seguinte padrão de ciclagem: 94°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min; 55°C por 30 s e 72°C por 3 min; 72°C por 7 min; e mantidos a 4°C até o momento do uso em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* (Ideal Lab®).

Quadro 2 — Oligonucleotídeos iniciadores para a PCR performada em todas as estratégias de clonagens. Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

(Continua)

| Oligonucleotídeos                         | Sequência 5' → 3'                                                                                                                            | Produto                                           |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| LC36-Completa-RBS<br>(BBp)_fw             | CTGAGG <b>AATTCAAAAAAAAAAATTCTAGAGAGCTGAT</b><br><b>TAACTAATAAGGAGGACAAACAT</b><br>GGGGCGAATCGACTCCTC                                        | ORF <i>lc36</i>                                   |
| LC36-Completa-Histag<br>(BBs)_rv          | TTAG <b>CTGCAGCGGCCGCTACTAGTATTATTAGTGAT</b><br><b>GGTGATGATGATGATG</b> GCCGCTGCT <b>GCTGCCGCGC</b><br><b>GGCACCAG</b> AGAGTTAGTCGGCAGCCGAGG |                                                   |
| Fw_Thrombin-LC36                          | AAACCATGGAA <b>CTGGTGCCGCGCGGCAGCATGGG</b><br><b>GCGAATCGAC</b>                                                                              | ORF <i>lc36</i>                                   |
| Rv_Thrombin-Lc36                          | AAAGATATC <b>AAGAGTTAGTCGGCAGCCGA</b>                                                                                                        |                                                   |
| Fw_pBS0E-MBP-<br>Thrombin-LC36            | AAAG <b>AATTCAAAAAAAAAAATTCTAGAGAGCTGATTA</b><br><b>ACTAATAAGGAGGACAAACATGAAAATCGAAGAA</b><br><b>GGTAAACTGGTAATCTGGATTAAC</b>                | MBP:: <i>lc36</i>                                 |
| Rv_pBS0E-MBP-<br>Thrombin-LC36            | TTAG <b>CTGCAGCGGCCGCTACTAGTATTATTAAG</b><br><b>AGTTAGTCGGCAGCCGAGG</b>                                                                      |                                                   |
| P. Fw-<br>LinJ22.0300_Trombin_<br>10/2019 | AAACCATGGAA <b>CTGGTGCCGCGCGGCAGCGACGC</b><br><b>AGAGTTCTTTCCCAAGAACC</b>                                                                    | ORF <i>lc06</i>                                   |
| Rv_Thrombin-Lc06                          | AAAGATATC <b>AGCGATTTCGAACGAACCCAC</b>                                                                                                       |                                                   |
| Fw_Thrombin-LC36<br>_774pb                | AAACCATGGAA <b>CTGGTGCCGCGCGGCAGCGGGCG</b><br><b>AA TCGACTCCTCTTG TG</b>                                                                     | LC36 Fragmento<br>774 pb                          |
| Rv_Thrombin-LC36<br>_774pb                | AAAGATATC <b>ACGCGACGTCCACCTGCT</b>                                                                                                          |                                                   |
| Fw_402                                    | GCGATATCCACTTCATCCACTC                                                                                                                       | Sequenciamento do<br>pBS0EXylRPxylA_<br>V2- [RFP] |
| Rv_403                                    | CGTTGGCCGATTCATTAATG                                                                                                                         |                                                   |

Azul – Biobrick Prefixo (EcoRI e XbaI); Lilás – Biobrick Sufixo (SpeI e PstI); Verde – Sítio de Trombina; Laranja – HisTag7; Marrom – Região de ligação ao ribossomo; Sítio NcoI e Sítio EcoRV. **Região para anelar à ORF.**

Quadro 2 — Oligonucleotídeos iniciadores para a PCR performada em todas as estratégias de clonagens. Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

(Conclusão)

| Oligonucleotídeos | Sequência 5'→3'                                                                                                                                    | Produto                    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Fw_472            | GCGTATTGCCGCCACTATG                                                                                                                                | Sequenciamento do pMAL-p5x |
| Rv_473            | TGTCCTACTAGGAGAGCGTTCAC                                                                                                                            |                            |
| Fw_EV0410         | CTGAGGAATTCAAAAAAAAAATTCTAGAGAGCTGAT<br>TAACTAATAAGGAGGACAAACATGGCGCAAGCGGT<br>GTCATCAGCGGAAGGAGGATCAAGAGCGGCGCTG<br>GAAGCGACAGAAGCGGCGGAAAGAGCGGA | EV0410                     |
| Rv_EV0410         | TTAGCTGCAGCGGCCGCTACTAGTATTATTAGTGAT<br>GGTGGTGATGATGATGATGCGCGCTGCTGCTGCCG<br>CGCGGCACCAGCGCTCTTTCTTGTTCGCTCTTTCC<br>GCCGCTTCTGTGCTTCCAGCGCCGCTC  |                            |

Azul – Biobrick Prefixo (EcoRI e XbaI); Lilás – Biobrick Sufixo (SpeI e PstI); Verde – Sítio de Trombina; Laranja – HisTag7; Marrom – Região de ligação ao ribossomo; Sítio NcoI e Sítio EcoRV. **Região para anelar à ORF.**

### 3.8 Manipulação de DNA

As análises dos DNAs foram feitas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), em tampão TAE 1X (Tris-Acetato  $40 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; EDTA  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,5), sob tensão de  $3 \text{ V.cm}^{-1}$  (Fonte BioRad), e visualização sob luz ultravioleta (UV). As imagens foram capturadas utilizando-se fotodocumentador “Capturador de Imagens” (Loccus Biotecnologia molecular Imaging). Os fragmentos de amplificação/restrrição foram purificados utilizando-se os kits *PCR Purification Kit* ou *Agarose Gel Extraction Kit* (Cellco Biotecnologia®), seguindo as instruções do fabricante. As Reações de digestão, desfosforilação e ligação de DNA seguiram as especificações dos fabricantes das enzimas.

### 3.9 Transformação bacteriana

*E. coli*: Para obtenção de *E. coli* Top 10, BL21, BL21 Códon Plus ou Rosetta eletrocompetentes, o processo se deu como previamente descrito, mas com algumas modificações (MILLER; NICKOLOF, 1995). Resumidamente, 2 mL de uma cultura, crescida durante a noite, foram inoculados em 250 mL de LB sob agitação a  $37^\circ\text{C}$  até alcançar Densidade Ótica, a 600 nm ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ), de 0,4-0,5. Seguidamente, são realizados três processos

de lavagens e centrifugações com água mili-Q gelada estéril, sendo o pellet da última centrifugação ressuspensão em glicerol 10% e a suspensão aliquotada em microtubos.

A alíquota de 35  $\mu\text{L}$  de bactéria eletrocompetentes, após adição do produto da ligação, foi transferida para uma cubeta de eletroporação com abertura de arco de 0,1 cm previamente resfriada no gelo. Após a eletroporação, realizada (“Programa 3”) no equipamento Nucleofector™ 2b Device (Lonza Biosciences), indicado para bactérias, o conteúdo da cubeta foi transferido para o meio LB, seguida de incubação em banho-maria a 37°C por uma hora. As bactérias foram, então, plaqueadas em meio sólido LB + ampicilina (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e incubadas em estufa a 37°C durante a noite.

*B. subtilis*: As cepas KO7 e  $\Delta 6$  foram transformadas como descrito a seguir: *B. subtilis* quimio-competentes, previamente preparadas de acordo com Bron *et al.* (1999), foram retiradas do freezer e deixadas em banho maria a 37°C por trinta minutos; o mesmo se fez com o meio SpII+EGTA. A bactéria quimio-competente foi diluída com o meio (proporção 1:1), seguido de adição de 1  $\mu\text{L}$  do DNA recombinante, e colocada para crescer por 1 hora em *shaker* a 250 rpm. Após este período de incubação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB + eritromicina (1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

### 3.10 Extração de DNA plasmidial (pDNA)

Minipreparação: Colônias bacterianas transformantes foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina, sendo incubadas, em seguida, por 16 horas em *Shaker* a 37°C e 250 rpm para a extração de pDNA. Recolheu-se 1,5 mL do pré-inóculo em microtubo, e a extração do pDNA foi realizada utilizando o kit QIAGEN® *Plasmid Miniprep Kit* (Qiagen) e PureYield™ *Plasmid Miniprep System* (Promega) conforme as especificações dos fabricantes. O pDNA foi eluído em água mili-Q estéril, quantificado em NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e armazenado a -20°C.

Midipreparação: Pipetou-se 25  $\mu\text{L}$  de um pré-inóculo das colônias transformantes em 50 mL de meio LB contendo 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina, seguido por incubação em *Shaker*, durante a noite, à 37°C sob agitação constante a 250 rpm. A extração do pDNA foi realizada utilizando o kit QIAGEN® *Plasmid Midiprep Kit* (Qiagen) conforme especificações do fabricante e eluído em 100  $\mu\text{L}$  de água mili-Q estéril, quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop Lite Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e armazenado a -20°C.

### 3.11 Sequenciamento

As sequências dos plasmídeos recombinantes obtidos neste trabalho foram confirmadas por sequenciamento no equipamento ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer* do Laboratório de Análises Biomoleculares Multiusuários da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. As amostras previamente preparadas com o *Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) utilizando oligonucleotídeos adequados.

### 3.12 PCR de colônia

Colônias transformantes, cultivadas durante a noite, foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, mantidas por cinco min em gelo e, posteriormente, lisadas em cinco ciclos de: aquecimento por um minuto em micro-ondas e incubação em gelo por trinta segundos. Um volume de 2 µL deste lisado foi utilizado como molde em reação de PCR.

### 3.13 Expressão de proteínas recombinantes

*B. subtilis*: para a expressão das proteínas LC36 e MBP::LC36, foi preparado um pré-inóculo (10 mL) cultivado durante a noite a 37°C sob agitação constante a 250 rpm e, posteriormente, transferido para 100 mL de meio LB, o qual foi incubado a 37°C a 250 rpm até a DO<sub>600nm</sub> atingir 0,7 (~ 6 horas). Neste ponto, adicionou-se xilose 0,5 % (estoque 50% m/v) para indução da expressão a 37°C, 30°C ou 25°C por 18 horas. As culturas induzidas foram centrifugadas a 6000 *g* por vinte minutos e os precipitados, armazenados a -20°C até o momento do uso.

*E. coli*: para a expressão das proteínas MBP::LC36 e LC36\_774pb, foi preparado um pré-inóculo (10 mL) cultivado durante a noite a 37°C sob agitação constante a 250 rpm e, posteriormente, transferido para 100 mL de meio LB suplementado com Glicose 20% m/v), o qual foi incubado a 37°C a 250 rpm até a DO<sub>600nm</sub> atingir 0,5 ou acima (~ 4 horas). Neste ponto, adicionou-se IPTG 0,3 mmol.L<sup>-1</sup> para indução da expressão. Realizou-se a indução a 37°C por 18 horas. As culturas induzidas foram centrifugadas a 6000 *g* por vinte minutos e os precipitados, armazenados a -20°C até o momento do uso.

### 3.14 Extração da proteína

Para o rompimento das bactérias recombinantes, os precipitados obtidos e descritos em 3.13 foram homogeneizados em tampão PBS ( $\text{NaCl}$  137  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$  2,7  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). As células de *B. subtilis* foram rompidas em sonicador (Ultronique, Eco-sonics Modelo: DESRUPTOR) por meio de 90 ciclos, enquanto as células de *E. coli* foram rompidas com oito ciclos, sendo cada ciclo composto de 15 segundos em sonicador e 10 segundos de repouso em gelo. Todos os extratos foram centrifugados a 6000 *g* por 20 minutos e tanto os sobrenadantes quanto os precipitados foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso. Para averiguar a expressão da proteína, os lisados foram resolvidos em gel SDS-PAGE 10% acrilamida/bisacrilamida (SAMBROOK et al. 2001). Após a corrida, os géis foram armazenados a  $4-8^\circ\text{C}$  (geladeira) até o momento do uso.

### 3.15 Western Blot

Para a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, utilizou-se o Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio Rad) a 2,5 A e tensão crescente até 25 V por três minutos. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da membrana por uma hora, com solução PBST ( $\text{NaCl}$  137 $\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$  2,7  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8  $\text{mmol.L}^{-1}$  e Tween20 0,05% v/v) BSA 3% m/v e incubação a temperatura ambiente com anticorpo anti-6His (Sigma-Aldrich) (1:1500) por uma hora. Em seguida, foi realizada a lavagem com solução PBST BSA 3% m/v por três vezes e incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com *Horseradish Peroxidase* (HRP) (Thermo Scientific™) (1:40000) por uma hora. Finalmente, a membrana foi lavada três vezes com solução PBST e revelada com solução *One-Step Ultra TMB-Blotting* (Bio Rad).

### 3.16 Obtenção do EV0410 para clonagem

Dois oligonucleotídeos de 40 pb, complementares e correspondentes, desenhados para codificarem o peptídeo EV0410 (30 resíduos de aminoácidos), foram diluídos em tampão pH 8 Tris-HCl 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  e EDTA 0,1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , combinados em microtubo na proporção 1:1, aquecidos a  $98^\circ\text{C}$  por 10 min e resfriados até a temperatura ambiente para permitir o anelamento das duas fitas de DNA. Em seguida, para a extensão das extremidades 5' *overhang*, misturou-se aos oligonucleotídeos 12,5 mM a seguinte solução: 0,2  $\text{mmol.L}^{-1}$  de dNTP; 1,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$  e 2,5 U de Taq Pfu. A reação ocorreu a  $72^\circ\text{C}$  por duas horas em

termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* (Ideal Lab®) seguida de purificação e digestão para os procedimentos de clonagem.

### 3.17 Predição de epítomos para células B

Para os epítomos de células B, utilizou-se o servidor IEDBB Cells (<http://tools.iedb.org/bcell/>, acessado em 06/06/20) e *Bepipred Linear Epitope Prediction* 2.0. O primeiro prevê epítomos usando combinação do método oculto de *Markov* e escala de propensão, calculando a possibilidade de a sequência de aminoácidos ser reconhecida pelas células B, (*threshold* igual a 0,35) (ANDERSEN; NIELSEN; LUND, 2006; JE.; O; M., 2006; LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006; PONOMARENKO; BOURNE, 2007). O segundo utiliza o algoritmo *Random Forest*, treinado com sequências peptídicas experimentalmente determinadas, como epítomos e não-epítomos, sendo selecionadas aquelas sequências a partir do *threshold* igual a 0,5 (JESPERSEN; PETERS; NIELSEN; MARCATILI, 2017). Utilizou-se, também, o servidor ABCpep (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html>, acessado em 06/06/20), o qual utiliza um banco de dados e uma rede neural artificial para predição de possíveis epítomos para células B (SAHA; RAGHAVA, 2006). Em seguida, os epítomos obtidos foram avaliados no Vaxjen 2.0 ([www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html](http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html), acessado em 06/06/20), o qual avalia antígenos pelas propriedades físico-químicas organismo-específicas, havendo valor mínimo de *threshold* igual a 0,5 (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007a; b; DOYTCHINOVA; FLOWER, 2008).

### 3.18 Síntese de Peptídeos

Para o presente estudo, três peptídeos foram sintetizados: o primeiro foi nomeado EV0410 (MAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERA-NH<sub>2</sub>) e derivado da proteína LC06, alvo de estudo por Lima (2015a), enquanto o segundo WC2013 (AQVMLYGSYALGLSLPS-NH<sub>2</sub>) e o terceiro WC2025 (PPLVMGDGTGGEDHAQ-NH<sub>2</sub>) foram derivados da proteína LC36 (NOGUEIRA; DEL CISTIA; URBACZEK; JUSI *et al.*, 2018). A síntese foi realizada em Laboratório de Síntese e Estudos de Biomoléculas, sob responsabilidade do Professor Eduardo Maffud, utilizando a metodologia descrita por Merrifield (1963) em resina Rink Amide e os Fmoc-aminoácidos acoplados pela ativação dos grupos carboxilas com diisopropilcarbodiimida (DIC) e N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), sendo que os reagentes citados foram utilizados com duas vezes de excesso em relação à quantidade

de grupos reativos na resina inicial. O grupo Fmoc foi retirado pela lavagem em 20% v/v 4-metilpiperidina/DMF (dimetilformamida) durante 1 e 20 minutos.

Entre as etapas de acoplamento e desproteção e vice-versa, a resina foi lavada com DMF, assim como realizado o teste de ninhidrina (KAISER; COLESCOTT; BOSSINGER; COOK, 1970) para detectar a presença de grupos amino livres, visto que, em temperaturas elevadas, há reação entre a ninhidrina e o grupo amino livre gerando um composto de coloração azul, indicativo da eficiência da síntese.

### **3.19 Reação de clivagem dos peptídeos**

Para a clivagem do peptídeo da resina ao final da síntese, foi necessário adição do ácido trifluoracético (TFA), 1,2-etanoditiol (EDT), triisopropilsilano (TIS) e água ultrapura (TFA 94%, TIS 1%, EDT 2,5% e H<sub>2</sub>O Mili-Q 2,5 % v/v) em frasco de cintilação sob agitação branda por 2 h. A relação entre volume da solução de clivagem e a massa de peptidil-resina foi de 1 mL de solução para cada 100 mg. A precipitação do peptídeo e da resina foi realizada em éter etílico gelado e o sobrenadante foi descartado, repetindo-se esse procedimento por três vezes. A separação entre o peptídeo e a resina se deu por solubilização do peptídeo em solução de água mili-Q contendo TFA 0,045% v/v e acetonitrila contendo TFA 0,036% v/v, sendo centrifugado para separar o peptídeo da resina. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

### **3.20 Purificação e caracterização dos peptídeos**

Os produtos obtidos da clivagem foram purificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), em modo semi-preparativo, com solvente A (H<sub>2</sub>O, TFA 0,045%) e solvente B (ACN, TFA 0,036%); fluxo de 5 mL.min<sup>-1</sup>; comprimento de onda para detecção a 220 nm; coluna C18, 250 mm x 10 mm, 300 Å; e tamanho da partícula de 5 µm (Phenomenex). Para a purificação do peptídeo EV0410, foi usado o gradiente de 15-45% de solvente B em 90 min; e o peptídeo WC2025 foi purificado com gradiente de 10-45% de solvente B em 90 min.

Após purificação e liofilização, a análise do grau de pureza de cada fração foi realizada em CLAE, em modo analítico acoplado a um espectrômetro Shimadzu, com coluna Ultrasphere Phenomenex de fase reversa C18 (4,6 mm x 150 mm, 300 Å, tamanho da

partícula de 5 µm) e detecção a 220 nm, utilizando método gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

As análises das massas moleculares dos peptídeos foram realizadas por espectrometria de massas, em espectrômetro de massa Bruker, injeção *ion trap* e modo *electrospray* positivo (M+H)<sup>+</sup>, na faixa de 200-2000 g.mol<sup>-1</sup>, para confirmar a obtenção do material desejado. O processo foi realizado no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais do Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.

### 3.21 Ensaio de Imunização e Imunoproteção

Camundongos BALB/c foram divididos em 4 grupos contendo dez animais cada para imunização via subcutânea. Animais do grupo I receberam PBS; do grupo II, 50 µg de saponina (*Saponin from quillaja bark* - S7900 - Sigma-Aldrich); do grupo III, PBS + 75 µg de cada peptídeo (EV0410 e WC2025); e do grupo IV, 50 µg de saponina + 75 µg de cada peptídeo (EV0410 e WC2025).

A imunização se deu por três doses (volume total = 100 µL), sendo a primeira dose no dia zero, a segunda, no dia 14 e a terceira, no dia 21. Sete dias posteriores à terceira dose, cinco animais foram eutanasiados e, os cinco restantes, infectados via intraperitoneal com 1x10<sup>8</sup> promastigotas de *L. infantum*, na fase estacionária de crescimento, e, finalmente, eutanasiados no 15º dia pós-infecção.

### 3.22 Obtenção do soro dos camundongos

Após a eutanásia, a sangria de cada camundongos se deu por punção cardíaca com seringas e agulhas estéreis/descartáveis. O sangue foi acondicionado em microtubo estéril de 1,5mL, mantido a temperatura ambiente para que a coagulação ocorresse e, em seguida, incubado em estufa a 37°C por 20 min. O coágulo foi separado e o restante centrifugado a 300 g por 10 minutos. Então, os soros foram colhidos e transferidos para novos microtubos estéreis e armazenados a -20°C até o momento do uso para a quantificação de anticorpos IgG e subclasses.

### 3.23 Imunização Passiva

Camundongos BALB/c foram divididos em três grupos contendo sete animais cada e imunizados passivamente com 100µL do soro (diluídos 1:2 em PBS) dos animais imunizados descrito no item 3.23. Os animais do grupo I receberam soro de BALB/c sadio; animais do grupo II, soro de BALB/c imunizado com PBS; e animais do grupo III, soro de BALB/c imunizado com Saponina+Peptídeos. 48 horas pós-imunização, os animais foram infectados via intraperitoneal com  $1 \times 10^8$  promastigotas *L. infantum* na fase estacionária e eutanasiados quinze dias pós-infecção (MCNOLTY; ANDERSON; STRYKER; DONDI, 2021).

### 3.24 Resposta Humoral

Placas de 96 poços Nunc MaxiSorp™ foram sensibilizadas com os peptídeos à concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em tampão carbonato ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 9,5) por 16 horas a 4°C. A seguir, lavada três vezes com solução PBST e bloqueada com solução PBST 5% m/v Molico sob agitação (20 rpm) por uma hora em temperatura ambiente. Os anticorpos obtidos dos camundongos imunizados foram diluídos em solução PBST 2,5% m/v Molico na razão 1:100 e incubados por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação. As placas foram, novamente, lavadas com PBST cinco vezes para proceder a incubação dos anticorpos secundários IgG, IgG1 e IgG2a de camundongos, produzidos em cabra, os quais foram conjugados com HRP (Abcam) por uma hora em temperatura ambiente sob agitação e, em seguida, foi realizada a revelação com solução reagente A e B (BD OptEIA™) na proporção 1:1 por 30 minutos na ausência de luz, seguida de leitura da absorbância, a 450 nm, em leitor de microplacas multimodal de absorbância Infinite® M200 PRO (Tecan).

### 3.25 Quantificação da carga parasitária

Para a determinação da carga parasitária, foi utilizado o índice de LDU (*Leishman-Donovan Units*), que consiste na relação entre número de amastigotas intracelulares por células nucleadas do hospedeiro e o peso do órgão parasitado (STAUBER, 1958). Para isso, após a eutanásia dos animais, foram realizadas impressões do fígado e baço em lâmina de microscopia, seguidas de fixação em metanol (8 minutos) e coloração pelo método do Giemsa. Sob microscopia óptica comum utilizando objetiva de imersão, observou-se a presença de células nucleadas infectadas ou não por *Leishmania*. O fragmento do órgão foi pesado para

posterior cálculo do índice de LDU (número de amastigotas de *Leishmania* por 1000 células nucleadas por peso do órgão).

### 3.26 Análise estatística

Para realização da análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad Prism 8. Foram realizadas a análise de variância (ANOVA) e a prova de Tukey para comparar as diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais. Foram considerados significativos os valores com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nogueira (2014), no desenvolvimento de tese de doutorado, demonstrou a imunorreatividade de uma forma truncada de LC36 contendo os primeiros 256 aminoácidos (LC\_256), cuja análise *in silico* revelou propriedades antigênicas interessantes para aplicação em imunodiagnóstico das leishmanioses. Na primeira parte do trabalho, conduzido durante o desenvolvimento deste projeto de mestrado, serão apresentadas as diferentes estratégias de clonagem da ORF *lc36* (2396 pb) para expressão das proteínas LC36 e/ou de sua forma truncada (LC36\_256) em sistemas heterólogos.

O planejamento inicial baseou-se no desenvolvimento de uma vacina viva, tendo bactérias como sistemas heterólogos de expressão de proteínas de *Leishmania* e agentes transmissores dos antígenos para o hospedeiro alvo. Segundo Ding *et al.* (2018), uma formulação vacinal deve, além de induzir a resposta do sistema imune inato, desencadear uma forte resposta do sistema imune adaptativo para, efetivamente, proteger o hospedeiro contra determinada infecção. No entanto, de acordo com os autores, as respostas mais duradouras e específicas são estimuladas por microrganismos vivos, que devido a composição de suas células, são naturalmente capazes de atuar como agentes adjuvantes quando em conjunto de antígenos alvos. Por outro lado, a administração de organismos vivos para mecanismo de entrega de antígenos requer atenção quanto à saúde humana ou animal, pois determinadas células bacterianas, como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*, que são usadas como vacinas vivas, são patogênicas e, por isso, estudos devem ser cuidadosamente realizados para que não haja quaisquer riscos para o público alvo (DING; MA; DONG; LIU, 2018). Desta maneira, o uso de microrganismo não patogênicos, como exemplo, *B. subtilis*, vem sendo alvo de estudo.

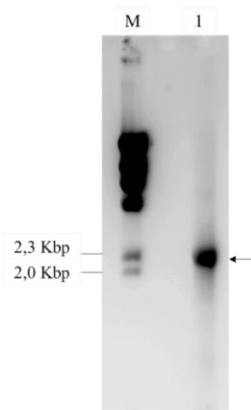
Os *B. subtilis* são bactérias gram-positivas consideradas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e, por esse motivo, são seguras para o ser humano e para os animais (HONG; DUC; CUTTING, 2005). Dentre as estratégias para o uso dessas bactérias como veículo de antígenos, tem-se a exposição de proteínas heterólogas na superfície dos esporos, que não requer a secreção via membrana, mas a expressão no momento da esporulação da bactéria (ISTICATO; CANGIANO; TRAN; CIABATTINI *et al.*, 2001). Durante a esporulação, pelo menos 70 proteínas são produzidas para compor a estrutura do esporo, dentre elas, algumas são essenciais para a formação da estrutura (MCKENNEY; DRIKS; ESKANDARIAN; GRABOWSKI *et al.*, 2010), enquanto outras participam da morfogêneses da crosta, a última camada do esporo, e são tipicamente usadas para ancorar antígenos, CotB (ISTICATO; CANGIANO; TRAN; CIABATTINI *et al.*, 2001), CotC (MAURIELLO; DUC; ISTICATO; CANGIANO *et al.*, 2004), CotG (KIM; LEE; KIM, 2005) e CotX (LI; NING; WU, 2010).

Sendo assim, as principais vantagens do *B. subtilis* são: administração oral, atuação dos esporos como adjuvantes, baixo custo de produção, geneticamente manipuláveis e termoestabilidade dos esporos (ROSALES-MENDOZA; ANGULO, 2015). Por esta razão, diferentes estratégias foram testadas na tentativa de expressar as proteínas LC36 MBP::LC36 e MBP::LC\_256aa em *B. subtilis* como método inicial para identificação da capacidade dessas células em expressar, no citoplasma, proteínas de *L. infantum*, e, posteriormente, migrar para a exposição dessas mesmas proteínas na superfície dos esporos.

#### **4.1 Um fragmento de 2396pb contendo toda a ORF *lc36* foi clonada no vetor pBS0EXylRPxylA\_V2**

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se a estratégia “*BioBrick*”, aplicada em Biologia Sintética, para clonagem da ORF *lc36* (PEDROLI; RIBEIRO; SQUIZATO; DE JESUS *et al.*, 2019). Para isso, as clonagens foram planejadas pautando-se em apenas quatro sítios de restrição na região de clonagem do plasmídeo pBS0EXylRPxylA\_V2: *EcoRI* e *XbaI* na região *upstream* (prefixo) e *SpeI* e *PstI* na região *downstream* (sufixo) ao gene marcador da proteína de fluorescência vermelha (RFP) (SHETTY; ENDY; KNIGHT, 2008). A ORF *lc36* foi amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos LC36-Completa-RBS (BBp)\_fw e LC36-Completa-Histag (BBs)\_rv (Quadro 2), obtendo-se um amplicom de 2.4 Kpb (Figura 1), o qual foi, posteriormente, digerido com *EcoRI* e *SpeI* e ligado ao vetor pBS0EXylRPxylA\_V2- [RFP], também aberto em *EcoRI* e *SpeI* para posterior transformação da linhagem de *E. coli* TOP10.

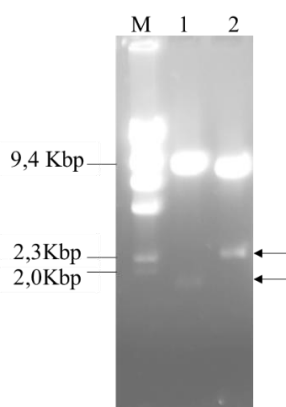
Figura 1 — Amplificação da ORF *lc36* (2396 pb). Fotografia dos produtos de eletroforese em gel de agarose 1% corado e com brometo de etídio. O amplicom (1) indicado pela seta foi obtido a partir da amplificação do gDNA de *L. infantum* com os oligonucleotídeos LC36-Completa-RBS (BBp)\_fw e LC36-Completa-Histag (BBs)\_rv, com a enzima Taq Dream (Thermo Scientific™) e Marcador de pares de bases  $\lambda$ -HindIII (New England) (M)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

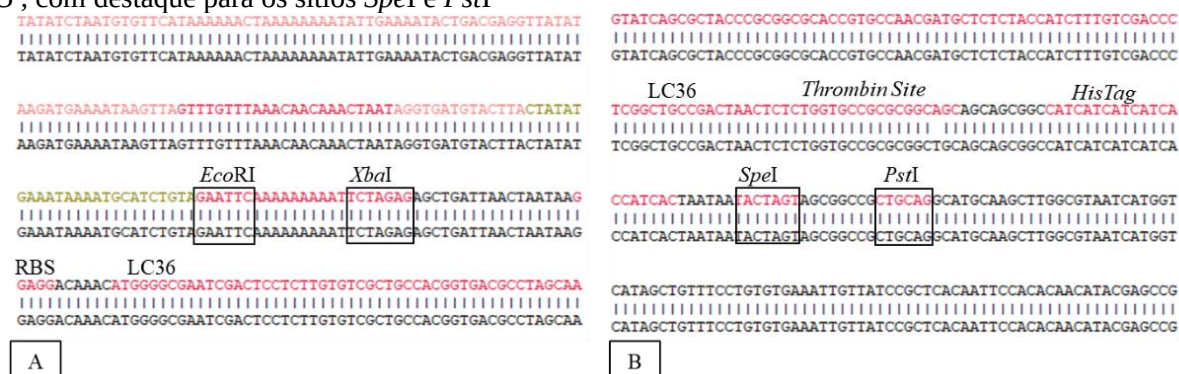
Uma colônia de *E. coli* ampicilina resistente foi selecionada. O pDNA extraído foi digerido com *Pst*I, gerando fragmentos de 8,6 e 1,7 Kbp (coluna 1 da Figura 2), e *Eco*RI/*Spe*I, gerando fragmentos de 8,3Kbp (plasmídeo) e 2,3Kbp (inserto) (coluna 2 da Figura 2) como esperado, indicando o sucesso desta primeira etapa. A sequência do vetor recombinante revelou a manutenção da fase aberta de leitura (Figura 3).

Figura 2 — Análise de restrição do pDNA obtido a partir de uma colônia de *E. coli* ampicilina resistente. Após a extração do pDNA com Kit QIAGEN *Plasmid Miniprep* (Qiagen), realizou-se a análise de digestão com a enzima *Pst*I (1), bandas esperadas de 8,6 Kbp e 1,7 Kbp (indicado pela seta), e *Eco*RI e *Spe*I (2), bandas esperadas de 8,0 Kbp e 2,3 Kbp (indicado pela seta). (M) Marcador de pares de bases  $\lambda$ -HindIII (New England)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

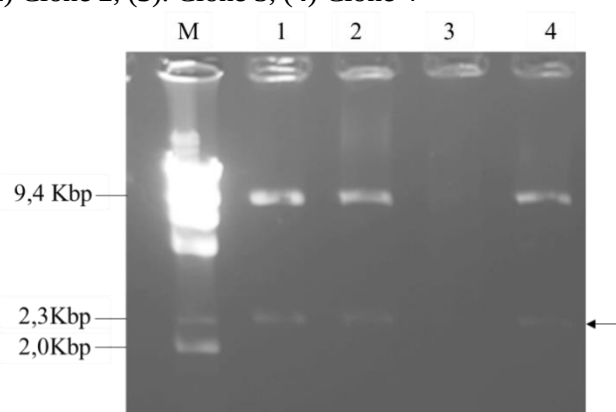
Figura 3 — Alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas a partir do sequenciamento do clone pBS0EXylRPxylA\_V2-LC36HisTag. Para a reação de sequenciamento, utilizou-se os oligonucleotídeos 403 e 402 e o Kit BigDye Terminator v3.1 *Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). No alinhamento entre a sequência LC36 (superior) e aquela obtida no sequenciamento (inferior), estão destacados os sítios de restrição. (A) Região 5', com destaque para os sítios *EcoRI* e *XbaI* e (B) Região 3', com destaque para os sítios *SpeI* e *PstI*



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

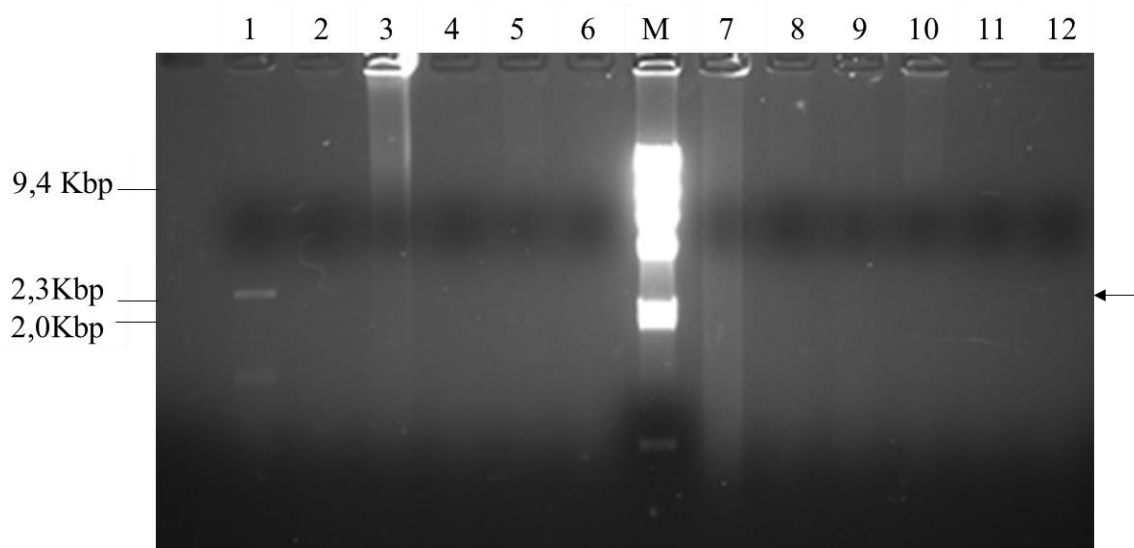
Após a confirmação da fase aberta de leitura, o plasmídeo recombinante, denominado pBS0EXylRPxylA\_V2-LC36HisTag (Figura 41, Anexo), foi utilizado para transformar as cepas KO7 e  $\Delta 6$  de *B. subtilis*, sendo a primeira, não expressora de sete proteases extracelulares, muito comuns em cepas selvagens, enquanto a segunda, possui parte do genoma deletado, direcionando todo o gasto energético para a expressão de genes essenciais e proteínas heterólogas. Colônias eritromicina resistentes foram selecionadas para extração e análise de pDNA (Figura 4 e 5).

Figura 4 — Análise de restrição dos pDNAs obtidos a partir de colônias *B. subtilis* KO7 eritromicina-resistentes. Após a extração do pDNA com Kit QIAGEN *Plasmid Miniprep* (Qiagen) das colônias eritromicina resistentes, realizou-se análise de restrição com as enzimas *EcoRI* e *SpeI* (colunas 1, 2, 3 e 4). A seta indica o fragmento linearizado de 2,4 Kbp. (M) Marcador de pares de bases  $\lambda$ -HindIII (New England). (1) Clone 1, (2) Clone 2, (3). Clone 3, (4) Clone 4



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

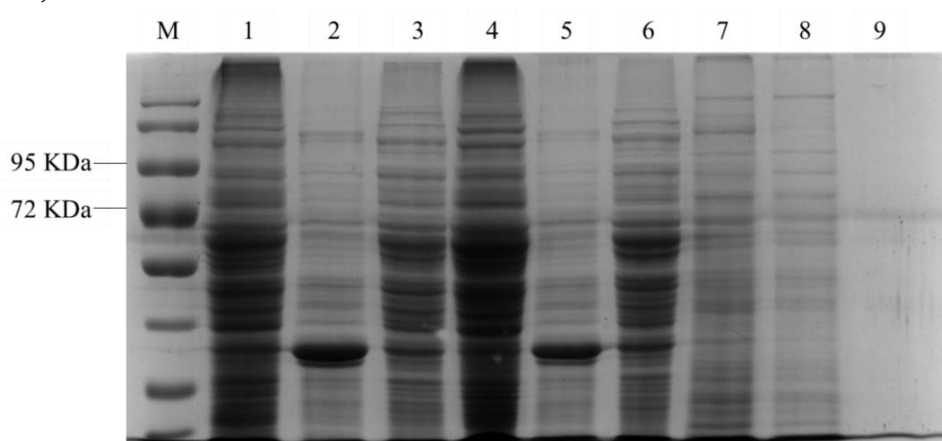
Figura 5 — Análise da amplificação do fragmento de 2775 pb dos pDNAs obtidos a partir de colônias *B. subtilis*  $\Delta 6$  eritromicina-resistentes. Após o cultivo das colônias de *B. subtilis*  $\Delta 6$  eritromicina resistentes em meio LB, as culturas foram centrifugadas e rompidas por ciclos de aquecimento e resfriamento e, então, o sobrenadante do rompimento foi usado para PCR com os oligonucleotídeos 402 e 403. (M) Marcador de pares de bases  $\lambda$ -HindIII (New England). (1 a 12) Clone 1 a 12. Apenas o clone 1 era positivo com banda de 2,7 Kbp indicada pela seta



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

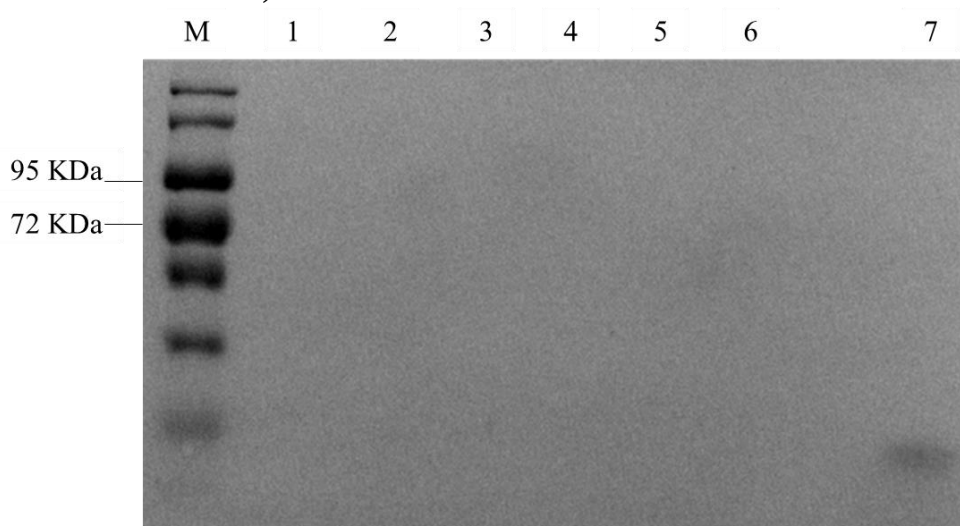
Para expressão da proteína LC36, uma colônia de *B. subtilis* KO7 albergando o plasmídeo recombinante pBS0EXylRPxylA\_V2-LC36HisTag foi cultivada a 25, 30 e 37°C durante a noite na presença de xilose para indução da expressão de LC36. A figura 6 mostra a análise do extrato proteico após a lise celular em gel SDS-PAGE, após 18hs de indução a 37°C, não sendo observada a banda de interesse de 80 KDa. Isso também foi observado para as demais condições de indução (dados não mostrados), o que foi, posteriormente, confirmado por análise de *western blot* utilizando-se o anticorpo de camundongo anti-His (*Sigma-Aldrich*), figura 7.

Figura 6 — Análise da expressão da proteína LC36 em *B. subtilis* KO7. Eletroforese em gel SDS-PAGE após extração das proteínas do *B. subtilis* KO7 induzido a 37°C por 18 horas. (M) Marcador *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific™). (1) Fração insolúvel- Clone 1, induzido. (2) Fração solúvel- Clone 1, não induzido. (3) Fração solúvel- Clone 1, induzido. (4) Fração insolúvel- Clone 4, induzido. (5) Fração solúvel- Clone 4, não induzido. (6) Fração solúvel- Clone 4, induzido. (7) Fração insolúvel- KO7 não transformado, induzido. (8) Fração solúvel- KO7 não transformado, não induzido. (9) Fração solúvel- KO7 não transformado, induzido



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

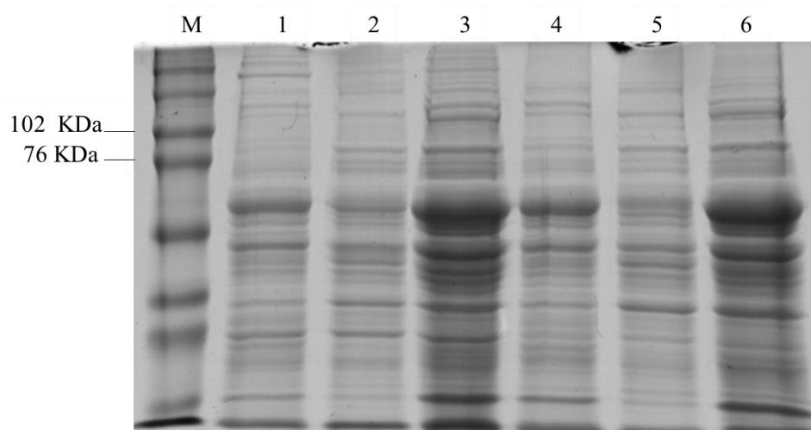
Figura 7 — Detecção da cauda de histidina. Membrana de nitrocelulose após revelação do Western Blot para *B. subtilis* KO7 induzido a 37°C para o clone 1. Como controle positivo, usou-se CPB-HisTag, proteína em trabalho no laboratório. (M) Marcador *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific™). (1) Clone 1 - Fração insolúvel. (2) Controle não induzido Clone 1 - Fração solúvel. (3) Clone 1- Fração solúvel. (4) KO7 – Fração insolúvel. (5) Controle não induzido KO7 – Fração solúvel. (6) KO7 – Fração solúvel. (7) Controle positivo (cisteíno protease de *Leishmania mexicana* fusionada à cauda de histidina)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

O mesmo procedimento foi realizado com a cepa  $\Delta 6$  transformante (Figura 8) e, também, a expressão de LC36 não foi obtida.

Figura 8 — Análise da expressão da proteína LC36 em *B. subtilis*  $\Delta 6$ . Eletroforese em gel SDS-PAGE após extração das proteínas do *B. subtilis*  $\Delta 6$  induzido a 37°C durante a noite. (M) Marcador *Full Range Rainbow*<sup>TM</sup> (GE Healthcare). (1) Fração insolúvel- Clone 1, induzido. (2) Fração solúvel- Clone 1, não induzido. (3) Fração solúvel- Clone 1, induzido. (4) Fração insolúvel-  $\Delta 6$  não transformado, induzido. (5) Fração solúvel-  $\Delta 6$  não transformado, não induzido. (6) Fração solúvel-  $\Delta 6$  não transformado, induzido



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

#### 4.2 A fusão de *Maltose Binding Protein* na porção amino terminal da LC36 não contribuiu para sua expressão em *E. coli* ou em *B. subtilis*

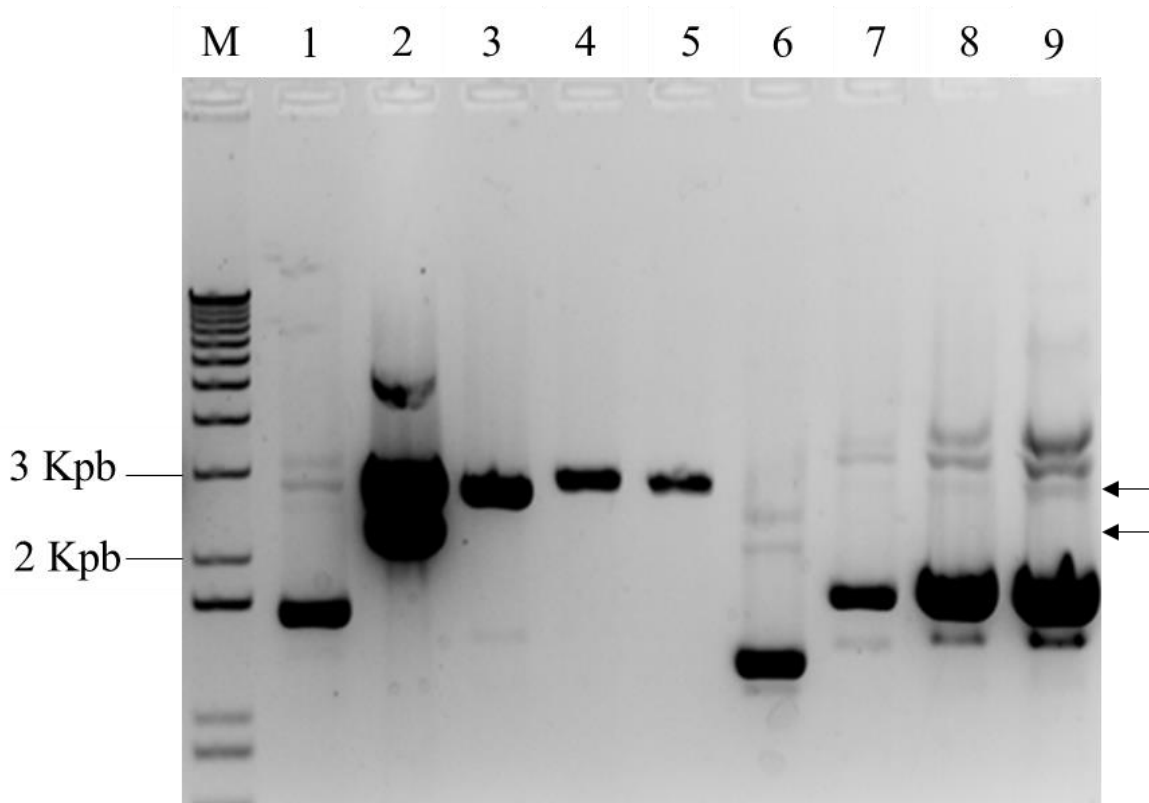
Trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório mostraram que a expressão da forma truncada da LC36 em *E. coli* resultou na formação de corpos de inclusão (NOGUEIRA, 2014). Desta forma, desenvolveu-se uma nova estratégia para expressão de LC36 fusionada à proteína *Maltose Binding Protein* (MBP), anteriormente demonstrada quanto à sua capacidade de promover a solubilidade de diferentes proteínas pouco solúveis e expressas em diferentes linhagens de *E. coli*, como laminina  $\beta 2$  humana (REUTEN; NIKODEMUS; OLIVEIRA; PATEL *et al.*, 2016), aquaporina Z de *E. coli* (HANG; PAN; NI; ZHENG *et al.*, 2016), Me2 do vírus influenza (YANG; YANG; WANG; HUANG *et al.*, 2017) e SIR2RP2 de *Leishmania donovani* (MITTAL; MUTHUSWAMI; MADHUBALA, 2017), todas alcançando bons níveis de expressão. Desta forma, optou-se por fusionar MBP na região N-terminal da LC36 e avaliar sua expressão tanto em *B. subtilis* quanto em *E. coli*.

Para isso, a ORF *lc36* foi amplificada utilizando-se os pares de oligonucleotídeos Fw\_Thrombin-LC3 e Rv\_Thrombin-LC3 contendo o sítio de restrição *NcoI* e *EcoRV*, assim como o sítio para trombina, para clonagem no plasmídeo pMAL-p5x (Quadro 2). Um amplicom de 2,2 Kpb foi, primeiramente, ligado ao vetor de clonagem pGEM® T-Easy, dando origem ao plasmídeo recombinante pGEM-Trombina-LC36 (Figura 42, Anexo), o qual foi confirmado por análise de restrição com as enzimas de restrição *NcoI/EcoRV*, gerando um

fragmento de 2,2 Kpb e outro, de 3,0 Kpb (coluna 2 figura 9). O pDNA pGEM-Trombina-LC36 foi, então, digerido com *NcoI/EcoRV*, e o fragmento de 3 Kpb extraído de gel de agarose e purificado para clonagem no vetor pMAL-p5x, também aberto em *NcoI/EcoRV* (Figuras 10).

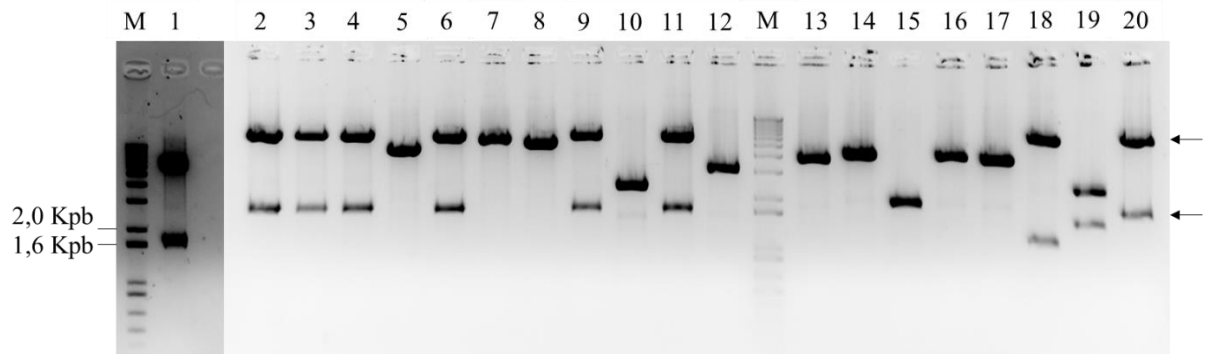
Utilizando como molde o pDNA pMAL-p5x-LC36 (Figura 43, Anexo) e oligonucleotídeos Fw\_pBS0E-MBP-Thrombin-LC3 e Rv\_pBS0E-MBP-Thrombin-LC3 (Quadro 2), obteve-se um amplicom contendo LC36 fusionada a MBP (MBP::LC36). Este fragmento foi digerido com *SpeI* e *EcoRI* e ligado ao vetor pBS0EXylRPxulA\_V2-[RFP], também aberto em *SpeI* e *EcoRI*, (Figuras 15).

Figura 9 — Análise de restrição do pGEM-Trombina-LC36 obtido a partir de colônias *E. coli* TOP10 ampicilina-resistentes. Após a extração do pDNA recombinante com MiniPrep (PureYield™ *Plasmid Miniprep System*), realizou-se a digestão nos sítios de restrição adequados, *NcoI* e *EcoRV*, em seguida revelado em gel de agarose para avaliação da clonagem do ORF *lc36* de *L. infantum* em vetor pGEM® T-Easy. (M) Marcador de pares de bases 1Kb *Plus* (Life). (1 a 14). Digestão do pDNA com as enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRV*, sendo esperados duas bandas (indicadas pelas setas) uma de 3,0 Kpb e outra de 2243pb (Clone 2)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

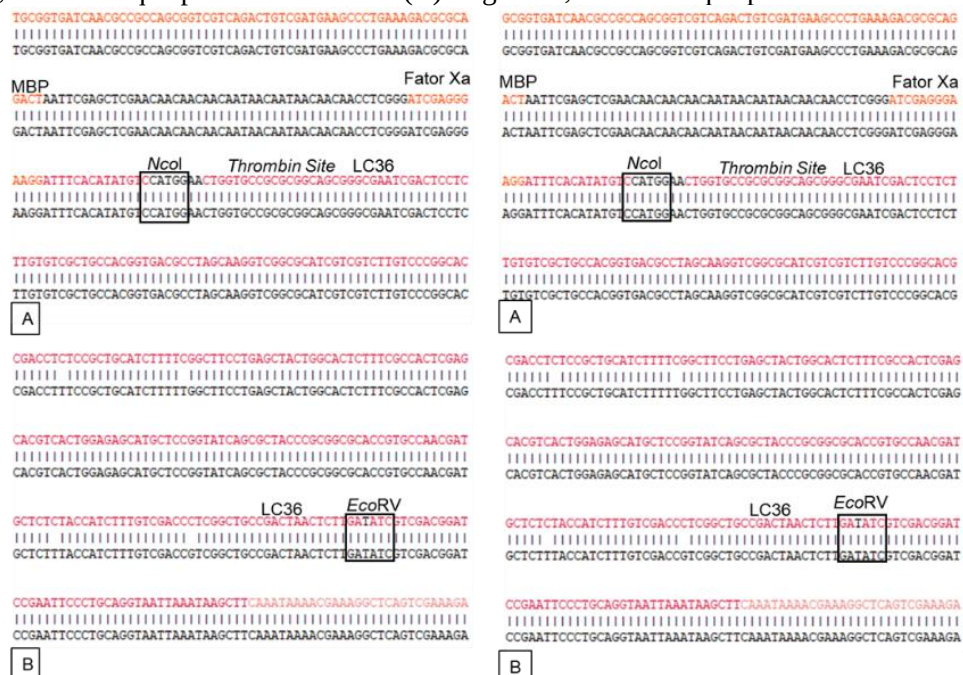
Figura 10 — Análise de restrição do pMAL-p5x-LC36 obtidos a partir de colônias *E. coli* TOP10 ampicilina-resistentes. Após extração do pDNA recombinante com Kit de MiniPrep (PureYield™ Plasmid Miniprep System, realizou-se a digestão com a enzima *Pst*I e revelado em gel de agarose para avaliação da clonagem da ORF *lc36* de *L. infantum* em pMAL-p5x, sendo esperados duas bandas (indicadas pelas setas) uma de 6,3 Kpb e outra de 1,7 Kpb. (M) Marcador de pares de bases 1Kb *Plus* (Life). (1 a 20) Clones. 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 18 e 20 são clones positivos



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Após sequenciamento dos clones recombinantes, apenas 1 e 11 foram confirmados por sequenciamento e, posteriormente, utilizados para transformar *E. coli* (Figura 11).

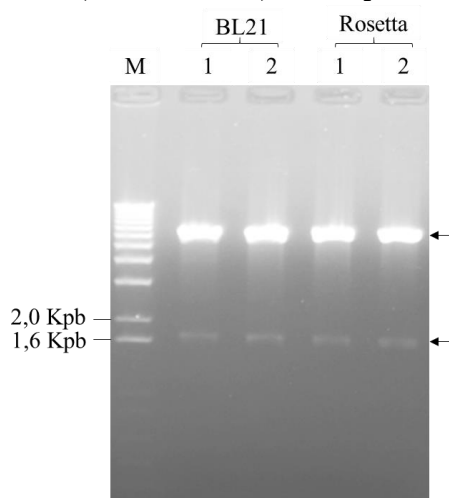
Figura 11 — Alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas a partir do sequenciamento dos clones pMAL-p5x-LC36. Dois dos oito clones obtidos foram confirmados: clones 1 (Imagem da Esquerda) e 11 (Imagem da Direita). Para reação de sequenciamento, utilizou-se os oligonucleotídeos 473 e 472 e o *Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). No alinhamento entre a sequência LC36 (superior) e aquela obtida no sequenciamento (inferior) estão destacados os sítios de restrição. (A) Região 5', com destaque para o sítio *Nco*I e (B) Região 3', com destaque para o sítio *Eco*RV



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Considerando as dificuldades experimentais anteriormente relatadas para expressão em *B. subtilis* e o fato de pMAL-p5x ser um plasmídeo para expressão de proteínas em *E. coli*, aproveitou-se a construção pMAL-p5x-LC36 para também transformar as linhagens BL21 e Rosetta (Figura 12).

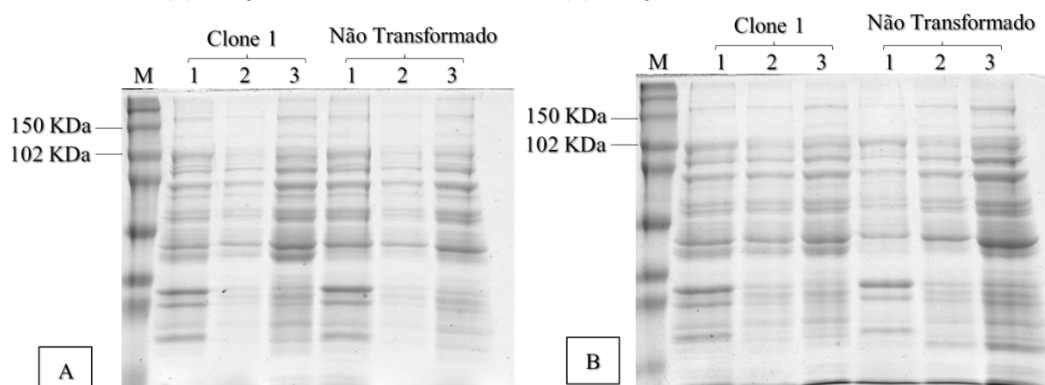
Figura 12 —Análise de restrição dos pDNAs obtidos a partir de colônias *E. coli* BL21 e Rosetta ampicilina-resistentes. Eletroforese em gel de agarose da digestão do pDNA extraído para confirmação da clonagem em *E. coli* BL21 e Rosetta, com a enzima *Pst*I, sendo esperadas duas bandas, uma de 6,3 Kpb e outra de 1,7 Kpb. **(M)** Marcador de pares de bases 1Kb *Plus* (Life). **(BL21 1 e 2)** Clone para a cepa BL21. **(Rosetta 1 e 2)** Clone para a cepa Rosetta



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

A figura 13 apresenta os géis de SDS-PAGE para ambas as cepas de *E. coli*, após indução da expressão da proteína MBP::ORF<sub>lc36</sub> de 125KDa e rompimento celular.

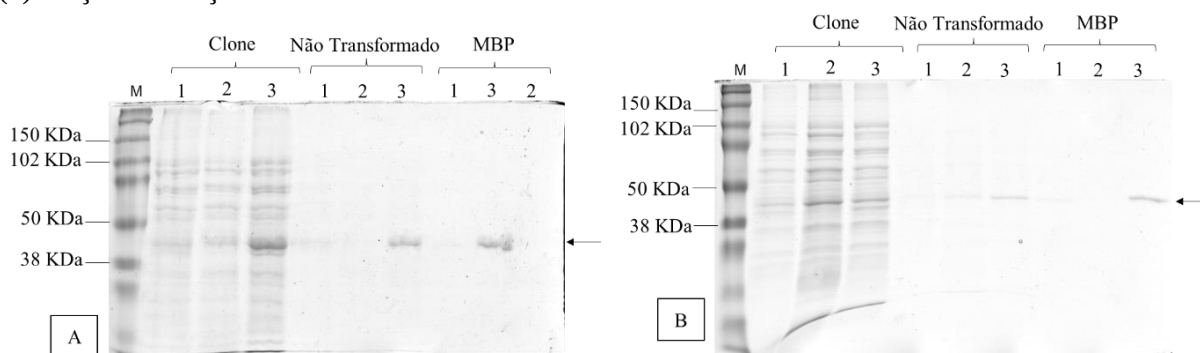
Figura 13 — Análise da expressão da proteína LC36 fusionada à MBP em *E. coli* BL21 e Rosetta. Eletroforese em gel SDS-PAGE após extração das proteínas de *E. coli* BL21 **(A)** e Rosetta **(B)**. A proteína fusionada possui 125 KDa. **(M)** Marcador *Full RAGE Rainbow™* (GE Healthcare). **(1)** Fração insolúvel- induzido. **(2)** Fração solúvel- não induzido. **(3)** Fração solúvel- induzido



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Observa-se na figura 13 que, para ambas as bactérias, não foi possível visualizar a banda referente à proteína de interesse. A eficiência na expressão pode ter sido baixa, já que esta pode ser de 1 a 20% da proteína total (pMAL *Protein Fusion & Purification System Instruction Manual*, New England Biolabs). Assim, alternativamente, considerando a capacidade de interação da MBP com amilose, utilizou-se também uma resina de amilose para purificação da proteína de fusão, utilizando-se como controle positivo clones de *E. coli* albergando apenas o vetor vazio, i.e., expressores apenas de MBP (Figura 14).

Figura 14 — Análise da expressão da proteína LC36 fusionada à MBP após purificação em resina de amilose. Eletroforese em gel SDS-PAGE após extração das proteínas de *E. coli* BL21 (A) e Rosetta (B) e purificação em resina de amilose. Proteína fusionada 125 KDa e MBP 42 KDa. (M) Marcador *Full Range Rainbow*<sup>TM</sup> (GE Helthcare<sup>TM</sup>). (1) Fração não adsorvida à coluna. (2) Fração da primeira lavagem. (3) Fração da eluição

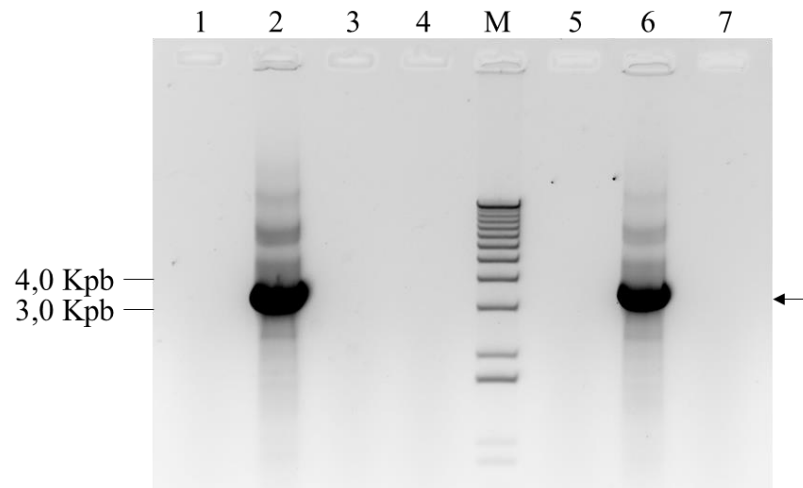


Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

É possível observar que, após a indução e utilizando o método de purificação baseado na amilose, também não obtivemos a expressão da proteína, embora o sistema de expressão esteja funcionando corretamente, já que foi possível verificar a expressão da MBP (Figura 14). Por outro lado, também foi possível observar a expressão da MBP na bactéria sem plasmídeo, o que pode ser devido à sua expressão basal, já que MBP é uma proteína bacteriana e faz parte do sistema maltose/maltosedextrina (DAHL; MANSON, 1985).

Paralelamente à tentativa de expressão de MBP::LC36 em *E. coli*, também se trabalhou na clonagem do inserto MBP::LC36 no plasmídeo pBS0EXylRPxulA\_V2-[RFP] para nova tentativa de expressão em *B. subtilis*. Após a clonagem, as colônias ampicilina resistentes foram confirmadas por PCR de colônia (Figura 15) e, posteriormente, sequenciados para confirmação da fase aberta de leitura (Figura 16).

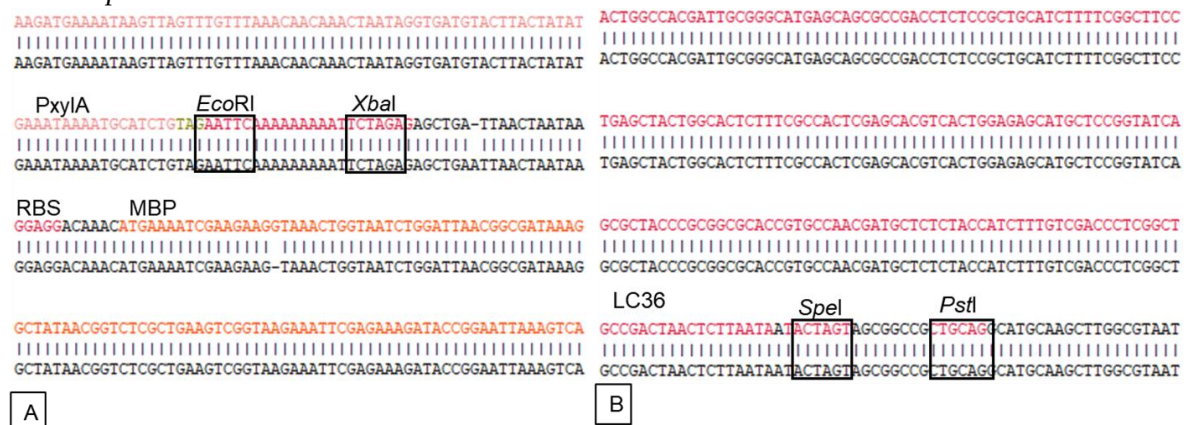
Figura 15 — Análise da amplificação do fragmento de 3499 pb dos pDNAs obtidos a partir de colônias *E. coli* TOP 10 ampicilina-resistentes. Após o cultivo das colônias de *E. coli* TOP10 ampicilina resistentes em meio LB, as culturas foram centrifugadas e rompidas por ciclos de aquecimento e resfriamento e, então, o sobrenadante do rompimento foi usado para PCR utilizando os oligonucleotídeos Fw\_pBS0E-MBP-Thrombin-Lc36 e Rv\_pBS0E-MBP-Thrombin-Lc36. (M) Marcador de pares de bases 1Kb *Plus* (Life). (1 a 7) PCR dos clones obtidos na transformação (3499pb). Apenas os clones 2 e 6 eram positivos



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

A reação de sequenciamento dos clones confirmou a correta ligação dos insertos no clone 2.

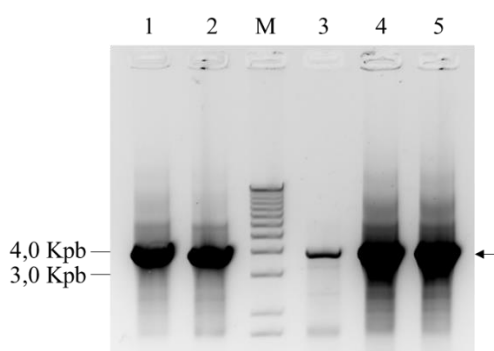
Figura 16 — Alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas a partir do sequenciamento do clone pBS0EXylRPxylA\_V2-MBP-Thrombin-LC36. Um dos dois clones obtidos foi confirmado, clone 2. Para a reação de sequenciamento, utilizou-se os oligonucleotídeos 403 e 402 e o Kit BigDye Terminator v3.1 *Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). No alinhamento entre a sequência MBP::LC36 (superior) e aquela obtida no sequenciamento (inferior), estão destacados os sítios de restrição. (A) Região 5', com destaque para os sítios *EcoRI* e *XbaI* e (B) Região 3', com destaque para os sítios *SpeI* e *PstI*



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Para avaliação da expressão, utilizou-se as cepas  $\Delta 6$  e KO7 de *B. subtilis*. Após transformação com o plasmídeo recombinante pBS0EXylRPxylA\_V2-MBP-Thrombin-LC36 (Figura 43, Anexo), obteve-se apenas colônias transformantes para a linhagem  $\Delta 6$  (Figura 17).

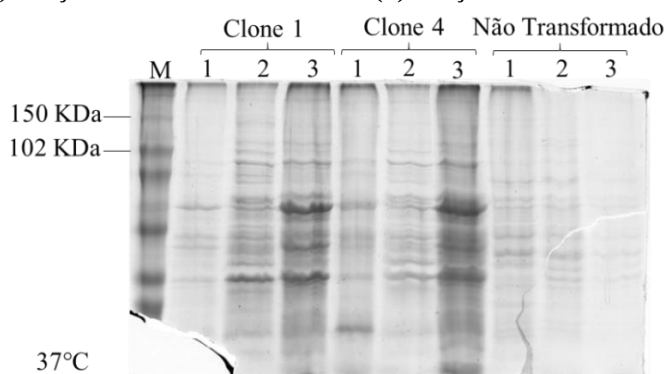
Figura 17— Análise da amplificação do fragmento de 3499 pb do pDNA pBS0EXylRPxylA\_V2-MBP-Thrombin-LC36 obtidos a partir de colônias *B. subtilis*  $\Delta 6$  eritromicina-resistentes. Após o cultivo das colônias de  $\Delta 6$  eritromicina resistentes em meio LB, as culturas foram centrifugadas e rompidas por ciclos de aquecimento e resfriamento e, então, o sobrenadante do rompimento foi usado para PCR utilizando os oligonucleotídeos 402 e 403. (M) Marcador de pares de bases 1Kb *Plus* (Life). 1, 2, 3, 4 e 5 são clones positivos



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Para ser usado para indução, escolheu-se os clones 1 e 4, como descrito anteriormente. A figura 18 mostra os extratos proteicos obtidos e separados em gel SDS-PAGE, sob indução por 12 horas à temperatura de 37°C. É possível concluir que, novamente, não houve expressão a 37°C nem em outras temperaturas estudadas (dados não mostrados) pela bactéria *B. subtilis*  $\Delta 6$ .

Figura 18 — Análise da expressão da proteína LC36 fusionada à MBP em *B. subtilis*  $\Delta 6$ . Eletroforese em gel SDS-PAGE após extração das proteínas do *B. subtilis*  $\Delta 6$  induzido a 37°C durante a noite. Tamanho da banda esperada 125KDa. (M) Marcador *Full Range Rainbow*<sup>TM</sup> (GE Helthcare). (1) Fração insolúvel- induzido. (2) Fração solúvel- não induzido. (3) Fração solúvel – induzido.

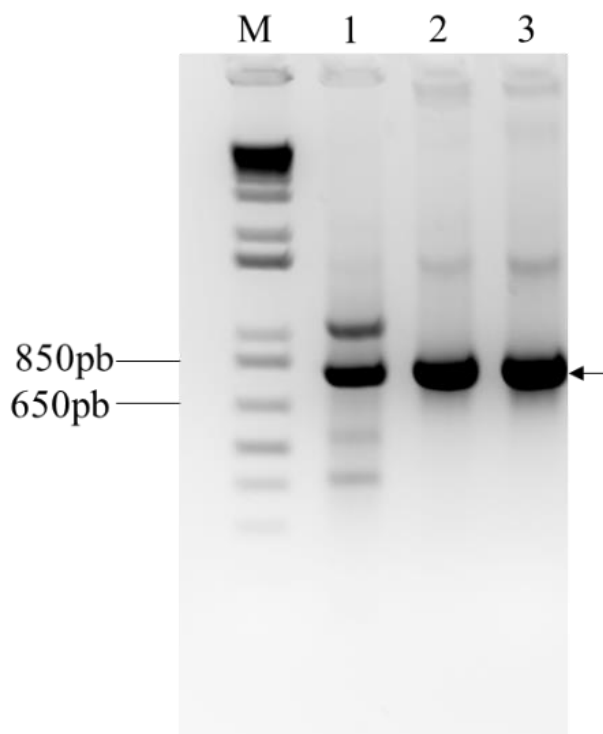


Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

### 4.3 Fragmento de 774pb da ORF *lc36* foi clonada em pMAL-p5x para expressão em *E. coli*

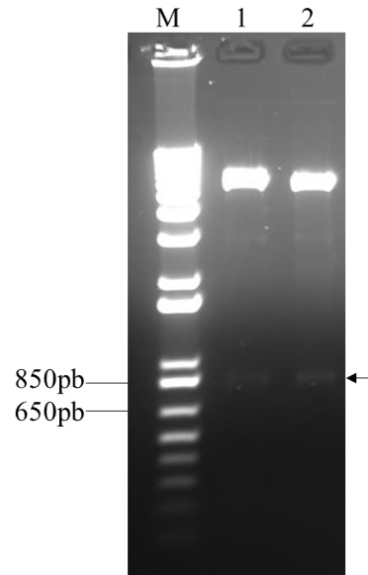
Como mencionado anteriormente, o nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a investigação da antigenicidade da proteína LC36. Neste sentido, Nogueira (2014) expressou um fragmento de 256 aminoácidos dessa proteína com o intuito de aplicá-la em diagnóstico de LV. Sendo assim, como esta proteína foi anteriormente expressa, embora majoritariamente em corpos de inclusão, Nogueira idealizou sua expressão fusionada à MBP. Para tanto, realizou-se à amplificação (Figura 19) do fragmento de 774 pb utilizando-se os oligonucleotídeos Fw\_Thrombin-LC36\_774pb e Rv\_Thrombin-LC36\_774pb (Quadro 2) para adição dos sítios *Nco*I e *Eco*RV à sequência. Após eletroforese e purificação do inserto, este foi ligado ao vetor pMAL-p5x também aberto com as mesmas enzimas. A figura 20 apresenta a análise de restrição do pDNA extraído de duas colônias de *E. coli* TOP10 ampicilina-resistentes com as enzimas *Nco*I e *Eco*RV.

Figura 19 — Amplificação do fragmento de 774pb da ORF *lc36*. Eletroforese do produto de amplificação de 774 pb da ORF *lc36* em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio a partir dos oligonucleotídeos Fw\_Thrombin-LC36\_774pb e Rv\_Thrombin-LC36\_774pb, indicado pela seta. (1) a partir do gDNA de *L. infantum* como molde, (2) pMAL-LC36 como molde, (3) pBS0EXylRPxylA\_V2-LC36HisTag como molde e (M) Marcador de pares de bases 1Kb *Plus* (Life)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

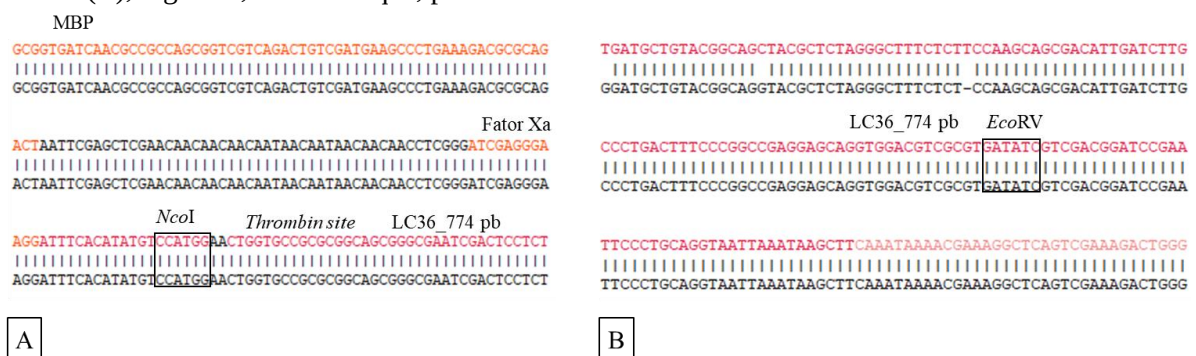
Figura 20 — Análise de restrição dos pDNAs obtidos a partir de colônias de *E. coli* TOP10 ampicilina-resistentes. Após a extração do pDNA recombinante com MiniPrep™ (*PureYield Plasmid Miniprep System*), realizou-se a digestão nos sítios de restrição adequados, *Nco*I e *Eco*RV, em seguida revelada em gel de agarose para avaliação da clonagem do fragmento de 774 pb da ORF *lc36* de *L. infantum* em vetor pMAL-p5x. (1 e 2) Clones e (M) Marcador de pares de bases 1Kb *Plus* (Life)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

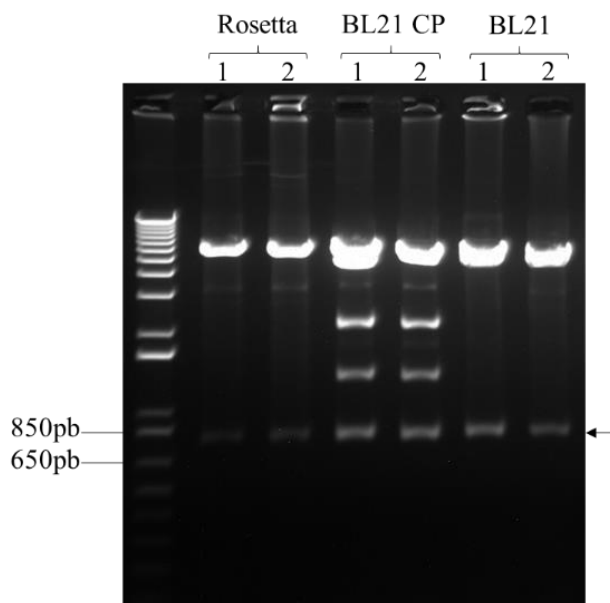
Após confirmação do clone 2 por sequenciamento (Figura 21), este DNA foi utilizado para transformar as linhagens de *E. coli* Rosetta, BL21 e BL21 *Codon Plus* (Figura 22). Em seguida, um clone de cada cepa bacteriana foi induzido com IPTG por 18 horas, rompido com disruptor ultrassônico e analisado via gel SDS-PAGE (Figura 23), verificando-se que não houve aparecimento da banda de 73 KDa como esperado.

Figura 21 — Alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas a partir do sequenciamento do clone pMAL-p5x\_Fragmento774 pb LC36. Um dos dois clones obtidos foi confirmado, clone 2. Para a reação de sequenciamento, utilizou-se os oligonucleotídeos 473 e 472 e o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). No alinhamento entre a sequência Lc36 e aquela obtida no sequenciamento, estão destacados os sítios de restrição. (A) Região 5', com destaque para o sítio *Nco*I e (B), região 3', com destaque, para o sítio *Eco*RV



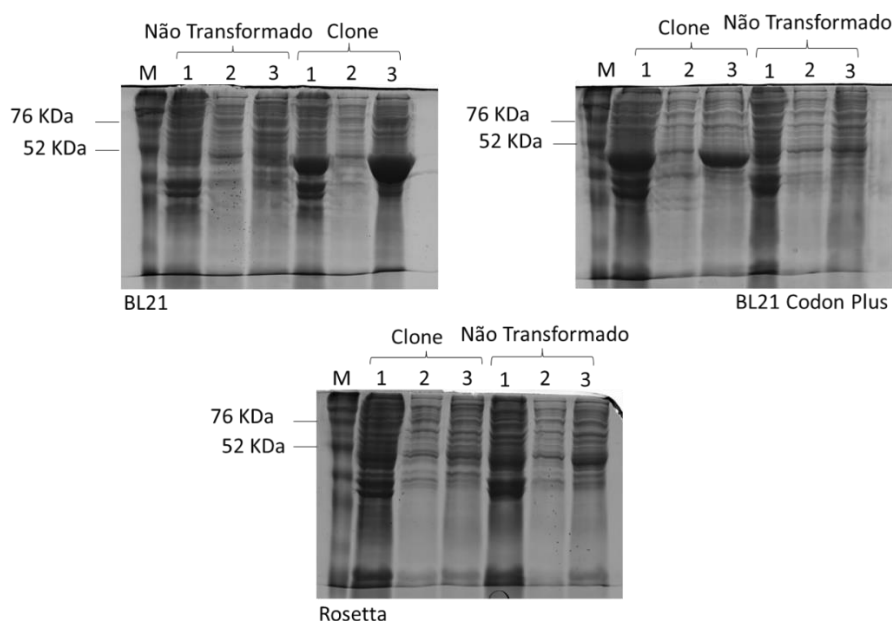
Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Figura 22 — Análise de restrição dos pDNA pMAL-p5x\_Fragmento774 pb LC36 obtidos a partir de colônias *E. coli* Rosetta, BL21 *Codon Plus* e BL21 ampicilina-resistentes. Eletroforese em gel de agarose da digestão do pDNA extraído para confirmação da clonagem em *E. coli* Rosetta, BL21 *Codon Plus* e BL21, com as enzimas *NcoI* e *EcoRV*, sendo esperadas duas bandas, uma de 5,7 Kpb e outra de 774 pb (indicado pelas setas). **(M)** Marcador de pares de bases 1Kb *Plus* (Life). **(Rosetta 1 e 2)** Clone para a cepa Rosetta, **(BL21 CP 1 e 2)** Clone para a cepa BL21 *Codon Plus* e **(BL21 1 e 2)** Clone para a cepa BL21.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Figura 23 — Análise da expressão do fragmento de 774pb da proteína LC36 fusionada à MBP em *E. coli* Rosetta, BL21 *Codon Plus* e BL21. Eletroforese em gel SDS-PAGE após extração das proteínas de *E. coli* BL21 **(A)**, BL21 *Codon Plus* **(B)** e BL21 **(C)**. A proteína fusionada possui 73 KDa. **(M)** Marcador Full RAGE Rainbow™ (GE Healthcare). **(1)** Fração insolúvel- induzido. **(2)** Fração solúvel- não induzido. **(3)** Fração solúvel- induzido



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

#### 4.4 Ampliação ORF *lc06* para clonagem e expressão nos sistemas heterólogos *B. subtilis* e *E. coli*

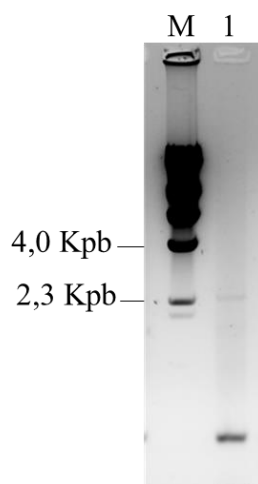
Outra proteína que este trabalho visa avaliar suas propriedades vacinais é aquela denominada LC06, previamente caracterizada quanto ao seu potencial antigênico (LIMA, 2015b). LC06 apresenta motivos de repetição em *tandem*, muito interessante devido às propriedades antigênicas (GOTO; CARTER; REED, 2008; GOTO; COLER; REED, 2007), como a A2 de *L. donovani*, a qual foi inicialmente identificada como fator de virulência e, hoje, é o antígeno utilizado na vacina Leish-Tec® (ZHANG; MATLASHEWSKI, 1997; ZHANG; MENDEZ; GHOSH; MYLER *et al.*, 2003).

Com base nestes achados e, considerando as dificuldades de amplificar sequências com muitas repetições, Evelin Costa Lima, durante o desenvolvimento de seu trabalho de conclusão de curso (LIMA, 2015b), sintetizou peptídeos de 20 a 40 resíduos contendo as repetições *em tandem* e demonstrou suas propriedades antigênicas.

Interessante notar que estas propriedades podem evidenciar um papel imunogênico, pois segundo Crumpton (1974) o primeiro evento da resposta imune celular estaria envolvido na combinação entre aspectos antigênicos de uma proteína e a complementaridade com receptores antigênicos de superfície. Desta forma, leva a pensar que um imunógeno é um antígeno, mas nem sempre o oposto é verdadeiro. Wu *et al.* (2007) demonstra esta relação entre duas proteínas homólogas do vírus da hepatite E, as proteínas HEV 239 e E2, as quais possuem antigenicidades similares, porém imunogenicidades distintas.

Dessa forma, a investigação das propriedades imunogênicas de LC06 foi realizada com base nos achados anteriores sobre a comprovada antigenicidade de peptídeo (LIMA, 2015b), porém, utilizando o sistema heterólogo de expressão bacteriana neste estudo. A estratégia adotada foi a mesma descrita para LC36, baseada na construção dos vetores de expressão para *E. coli* e *B. subtilis*. Assim, após a amplificação da sequência nucleotídica correspondente à LC06 (3918pb), esta seria utilizada para clonagem em pMAL-p5x e pBS0EXylRPxylA\_V2-[RFP], como descrito para LC36. No entanto, mesmo após aplicação de vários protocolos de amplificação, obteve-se bandas inespecíficas (Figura 24). Esta dificuldade experimental pode ser explicada pela presença das repetições em *tandem* características destas sequências. Assim, nova estratégia de amplificação foi adotada, agora, restringindo o amplicom para a sequência codificadora do antígeno EV0410.

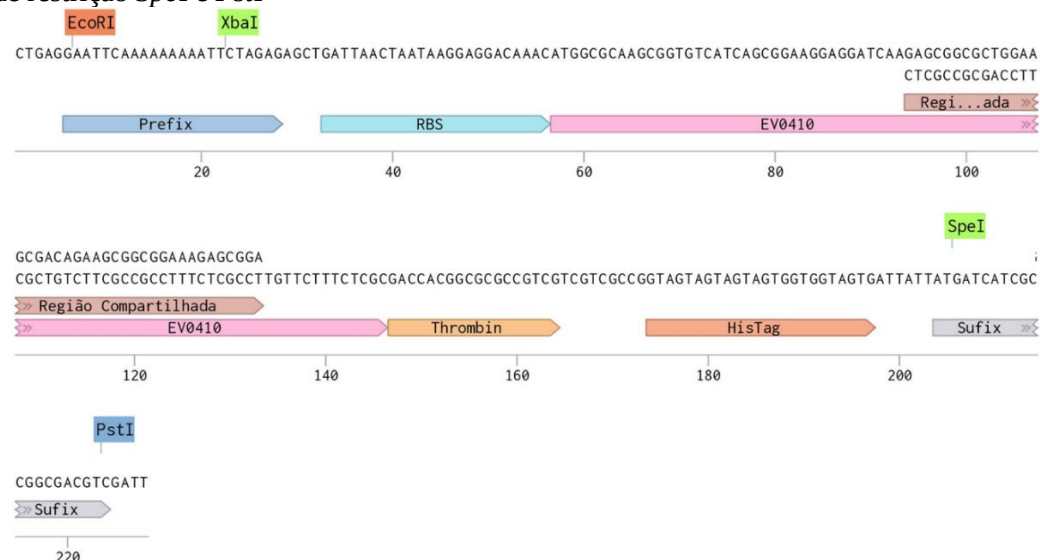
Figura 24 — Análise da amplificação da ORF *lc06*. Eletroforese em gel de agarose para avaliar a amplificação da ORF *lc06* (~3918pb) de *L. infantum* com os oligonucleotídeos P. Fw-LinJ22.0300\_Trombin\_10/2019 e Rv\_Thrombin-Lc06. (M) Marcador de pares de bases  $\lambda$ -HindIII (New England). (1) Amplificação da ORF *lc06* com 3918pb esperados.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

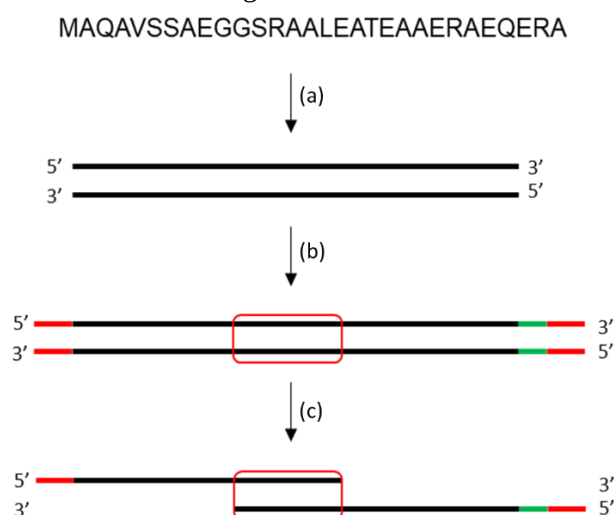
Alternativamente, desenhou-se dois oligonucleotídeos direto e reverso de 133 e 135 pb contendo a região codificadora do peptídeo EV0410, baseada no *codon usage* de *B. subtilis*, sendo, ainda, adicionados às extremidades de cada um, sítios de restrição adequados para clonagem do inserto no vetor e, também, região de ligação ao ribossomo. No oligonucleotídeo reverso, além dos sítios de restrição, uma sequência codificadora para sete resíduos de histidina também foram acrescentadas. O oligonucleotídeo direto contém 40 nucleotídeos complementares à sequência do oligonucleotídeo reverso (Figuras 25 e 26). Os oligonucleotídeos foram, então, aquecidos a 98°C e, depois, transferidos para a temperatura ambiente, para permitir o processo de anelamento das regiões complementares. Para o alongamento das extremidades fita simples 5' *overhang*, esse substrato foi utilizado como molde em uma reação de PCR em termociclador.

Figura 25— Esquema dos oligonucleotídeos Fw\_EV0410 e Rv\_EV0410 desenhados com base na sequência do peptídeo EV0410. Em destaque, está a região de complementariedade com 40 nucleotídeos de extensão, flanqueada pelos componentes *BioBricks upstream*: prefixo e sítios de restrição *EcoRI* e *XbaI*; região de ligação ao ribossomo (RBS) e *downstream*: trombina, His-Tag e sufixo contendo os sítios de restrição *SpeI* e *PstI*



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Figura 26 — Esquema do desenho dos oligonucleotídeos Fw\_EV0410 e Rv\_EV0410 na estratégia de clonagem da sequência que codifica o peptídeo EV0410. (a) A sequência do peptídeo EV0410 foi convertida ao correspondente nucleotídico baseado no códon *usage* do *B. subtilis*. (b) Para a estratégia de clonagem em pBS0EXylRPxylA\_V2-[RFP], foram adicionadas as sequências do *BioBrick* prefixo, sufixo, região de ligação ao ribossomo (vermelho) e HisTag7 (verde). (c) Para o desenho dos oligonucleotídeos a serem sintetizados, considerou-se apenas as regiões 5' *overhang* desenhadas a partir da região de complementariedade entre os oligonucleotídeos

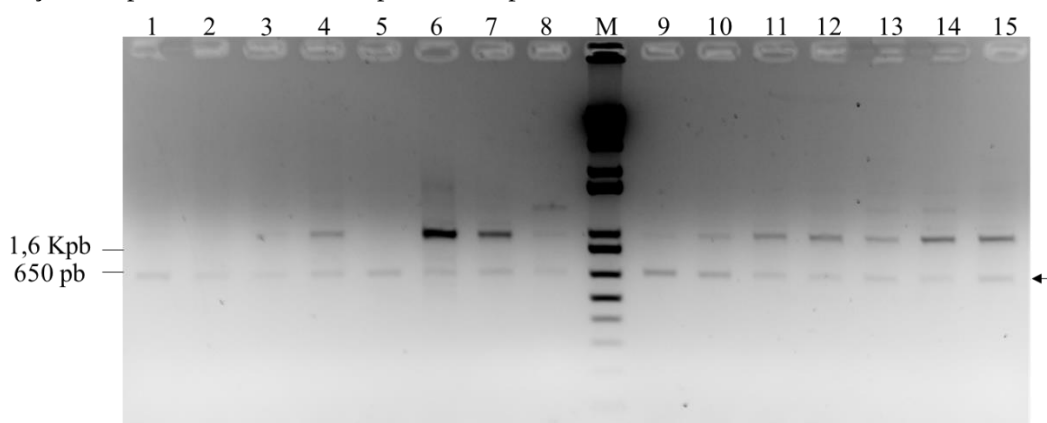


Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Após purificação, digestão e ligação, *B. subtilis* Δ6 foi transformado e confirmado via PCR de colônia (Figura 27), sendo que, dos 15 clones, apenas dois deles (2 e 5)

não apresentaram bandas inespecíficas e foram escolhidos para sequenciamento. No entanto, devido à constante degradação do pDNA para a análise, não foi possível prosseguir com estes clones.

Figura 27 — Análise da amplificação do fragmento de 650 pb dos pDNAs obtidos a partir de colônias *B. subtilis*  $\Delta 6$  eritromicina-resistentes. Após o cultivo das colônias de  $\Delta 6$  eritromicina resistentes em meio LB, as culturas foram centrifugadas e rompidas por ciclos de aquecimento e resfriamento e, então, o sobrenadante do rompimento foi usado para PCR utilizando os oligonucleotídeos 402 e 403. As amostras foram reveladas em gel de agarose para confirmar a clonagem do peptídeo LC06. (M) Marcador de pares de bases 1Kb *Plus* (Life). (1 a 15) Clones. Clones positivos 2 e 5 devido a não amplificação inespecífica. Tamanho esperado 650pb



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

#### 4.5 Mapeamento e síntese em fase sólida de peptídeos ligantes de linfócitos B

Devido às dificuldades enfrentadas no processo de expressão heteróloga das proteínas, decidiu-se por explorar, como alternativa, a síntese química de peptídeos. Este processo, embora limite o tamanho dos peptídeos produzidos, possibilita a não dependência microbiana para expressão proteica, possibilitando, inclusive, a remoção de possíveis contaminações biológicas para a formulação pretendida (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016). De fato, esta estratégia vem sendo aplicada para o desenvolvimento de vacinas contra esquistossomose (EL RIDI; MAHROUS; AFIFI; MONTASH *et al.*, 2001); contra clamídiase em bovinos (NYARI; KHAN; RAWLINSON; WAUGH *et al.*, 2018); tumores (DAKAPPAGARI; DOUGLAS; TRIOZZI; STEVENS *et al.*, 2000; DAKAPPAGARI; PYLES; PARIHAR; CARSON *et al.*, 2003); infecções estafilocócicas (HAJIGHAHRAMANI; NEZAFAT; ESLAMI; NEGAHDARIPOUR *et al.*, 2017) e também leishmaniose visceral (AGALLOU; ATHANASIOU; KOUTSONI; DOTSIKA *et al.*, 2014; AGALLOU; MARGARONI; KARAGOUNI, 2011; COSTA; GOULART; PEREIRA; LIMA *et al.*, 2014; MARTINS; DUARTE; CHAVEZ-FUMAGALLI; MENEZES-SOUZA *et al.*, 2015).

No entanto, a técnica de síntese química de peptídeos apresenta algumas limitações quanto à pureza, a qual diminui à medida que o comprimento da cadeia peptídica aumenta, devido à acoplamentos comprometidos, resultando na formação de uma população de sequências não desejadas (MACHADO; LIRIA; PROTI; REMUZGO *et al.*, 2004). Desta forma, considerando que peptídeos sintéticos de 15 ou 30 resíduos podem ser produzidos com graus de pureza e rendimento satisfatórios, trabalhou-se na identificação de prováveis determinantes antigênicos na sequência da proteína LC36, utilizando-se análises *in silico* de imunoinformática para identificação de pequenas sequências peptídicas reconhecidas pelo Complexo de Histocompatibilidade (MHC) (tabelas 1 e 2, anexo) e/ou pelos linfócitos B (tabela 3) B (VAKILI; NEZAFAT; ZARE; ERFANI *et al.*, 2020). Para isso, utilizou-se os servidores Rankpep, IEDEB, NetMHCpan, IFNepitope, ABCpep e Vaxijen.

Tabela 1 — Epítomos para Linfócitos B segundo os três servidores utilizados. Cada peptídeo com a pontuação/classificação de acordo com cada método. Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

| Epítopo           | IEDB | ABCpep <sup>a</sup> | Vaxijen |
|-------------------|------|---------------------|---------|
| PPLVMGDTGGEDHAQ   | -    | 0,88                | 1,111   |
| DGYTQAGLTRTSGATT  | -    | 0,92                | 0,399   |
| TTTATTPISRТАASTP  | -    | 0,9                 | 0,90    |
| PRYAEAAAAHVATQLS  | -    | 0,72                | 0,411   |
| EQLRNSATFPELEVEV  | -    | 0,67                | 0,492   |
| AQVMLYGSYALGLSLPS | -    | 0,57                | 1,076   |
| LWKFLSADAFANGYQV  | -    | 0,59                | 0,077   |
| CGEAGDSAALPKQLPL  | -    | 0,69                | 1,200   |
| ADAFANGYQVADAFGD  | +    | -                   | 0,206   |

<sup>a</sup> Maior o valor da pontuação maior probabilidade de ser epítopo; (-) ausência; (+) predito pelo servidor IEDB.

*Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios e infectam células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente, macrófagos. Uma vez fagocitado, o parasita é capaz de modular a resposta da célula, interferindo no perfil da resposta imunológica de Th1 para Th2 favorecendo, assim, o estabelecimento da infecção e progressão da doença (GREGORY; OLIVIER, 2005; ROSSI; FASEL, 2018). Desta forma, para reverter a infecção, é necessário a ativação do macrófago e polarização da resposta para Th1, o que é possível via produção de IFN- $\gamma$  (MANTOVANI; SICA; SOZZANI; ALLAVENA *et al.*, 2004). Interessante

notar que a capacidade de as células B atuarem como células apresentadoras de antígenos e serem capazes de polarizar a resposta imune a Th1 torna-as um bom alvo para o desenvolvimento de vacina para o controle das leishmanioses.

Os epítomos obtidos pelo servidor IEDB (tabela 3) compreendem peptídeos que variam de 2 a 76 aminoácidos, ligantes de células B. Entretanto, considerando a limitação da estratégia de síntese química (MACHADO; LIRIA; PROTI; REMUZGO *et al.*, 2004), optou-se pela seleção de peptídeos de 16 aminoácidos para prosseguimento nas análises de imunogenicidade.

Desta forma, os peptídeos AQVMLYGSYALGLSLPS (WC2013) e PPLVMGDGTGGEDHAQ (WC2025), selecionados com base no fragmento de 256 aminoácidos, previamente caracterizados como imunorreativos frente a soros de cães infectados por *L. infantum* (Nogueira *et al.*, 2018), assim como MAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQER A (EV0410) (Lima 2015), também ligante para células B, foram escolhidos para síntese em fase sólida, partindo de 200 mg de massa inicial de resina *Rink Amide* e de 200 mg, 205 mg e 217,5 mg para os peptídeos EV0410, WC2013 e WC2025 respectivamente. Ao final da síntese, obteve-se 336,05 mg, 334,75 mg e 445 mg de massas de peptidil-resina, com ganho de massa de 135,5 mg, 129,75 mg e 227,5 mg para os peptídeos EV0410, WC2013 e WC2025 respectivamente (tabela 4).

Tabela 2 — Rendimento da síntese dos peptídeos EV0410, WC2013 e WC2025. Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

| Peptidil-resina                | Ganho de massa (mg) | Ganho de massa teórico (mg) | Rendimento (%) |
|--------------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------|
| MAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERA | 135,5               | 276,0                       | 49,09          |
| AQVMLYGSYALGLSLPS              | 129,7               | 169,9                       | 76,30          |
| PPLVMGDGTGGEDHAQ               | 227,5               | 229,9                       | 98,96          |

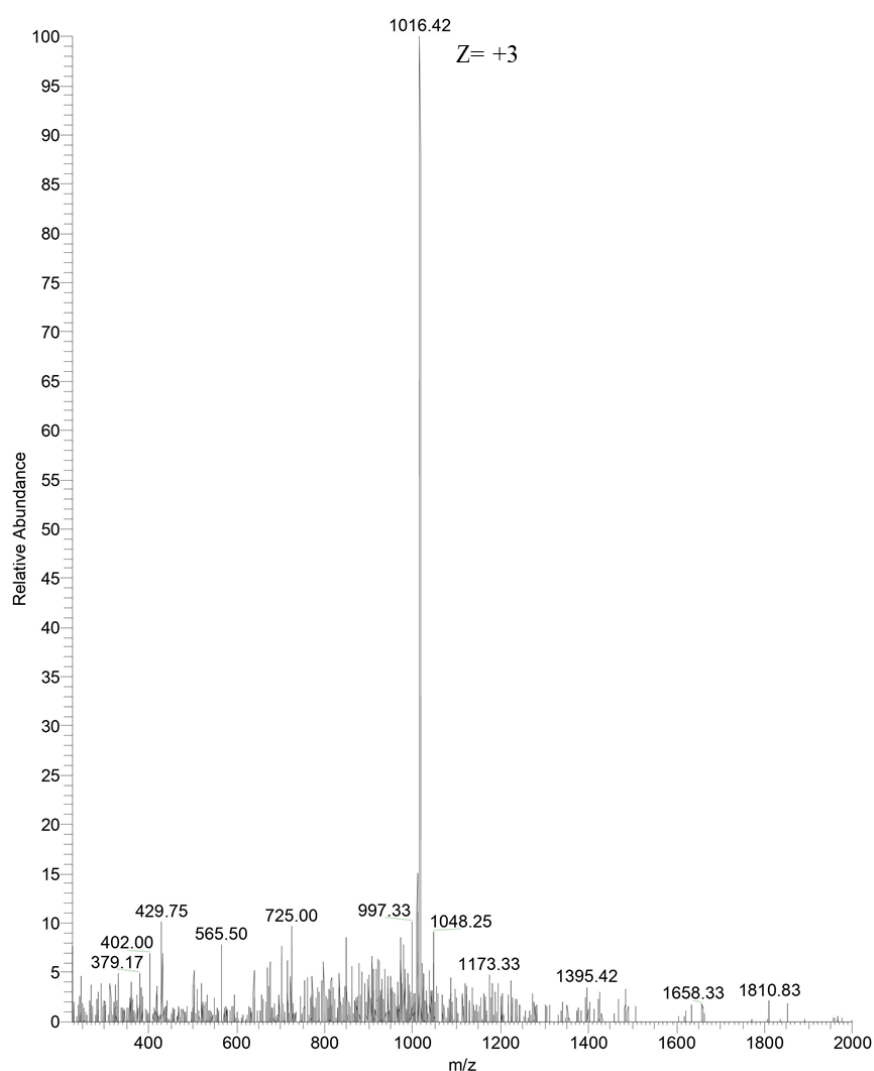
Após a síntese, as peptidil-resinas foram clivadas e o material bruto, separado da resina por solubilização em H<sub>2</sub>O e acetonitrila. As massas de peptídeos brutos liofilizados obtidas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 — Rendimento da clivagem dos peptídeos EV0410, WC2013 e WC2025. Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

| Peptidil-resina                | Massa bruta<br>(mg) | Massa bruta<br>teórica (mg) | Rendimento<br>(%) |
|--------------------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------|
| MAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERA | 221                 | 304,70                      | 72,53             |
| AQVMLYGSYALGLSLPS              | 116                 | 176,91                      | 65,57             |
| PPLVMGDGTGGEDHAQ               | 84,3                | 157,98                      | 53,36             |

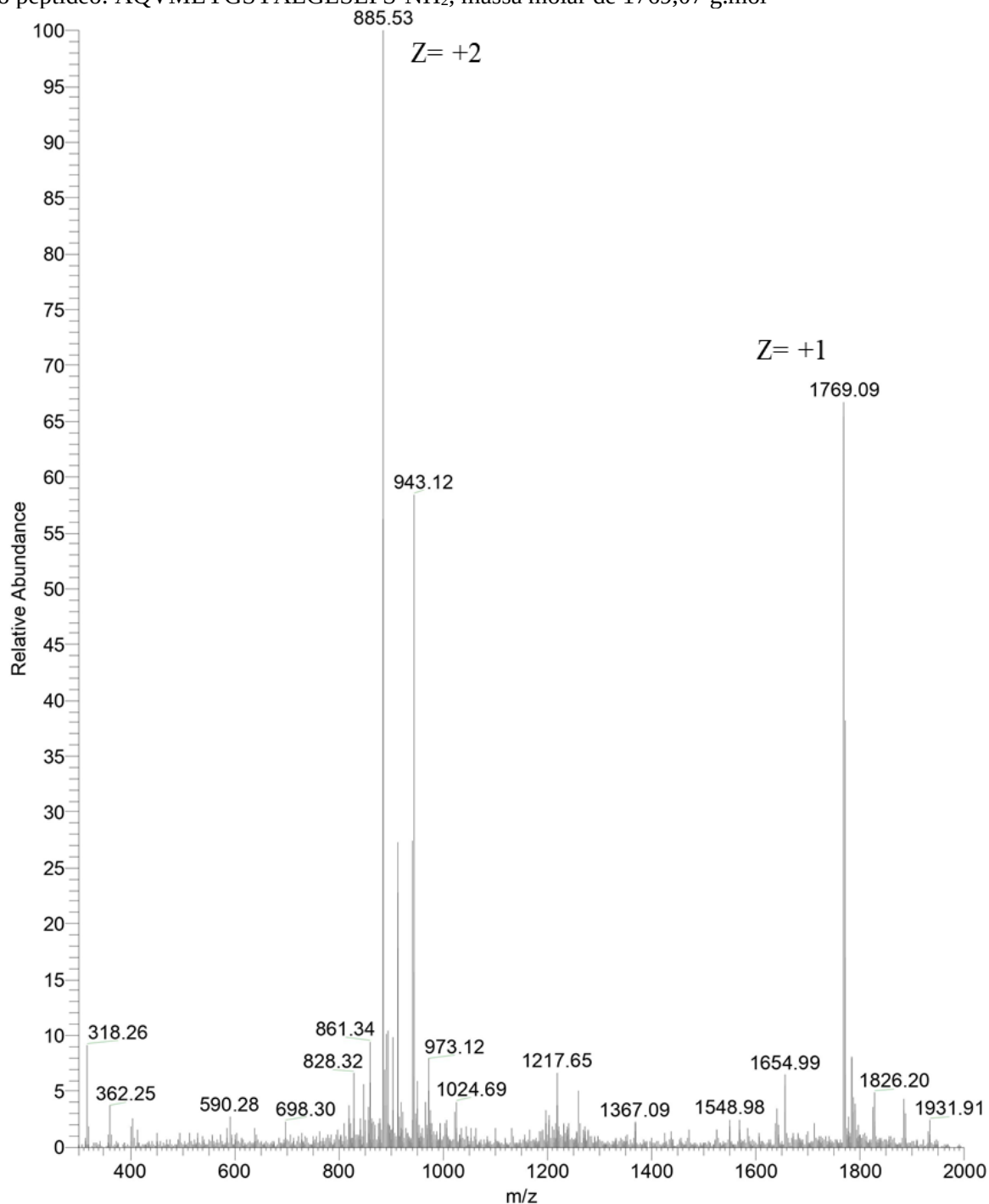
Após liofilização, procedeu-se a análise por espectrometria de massas para confirmação da síntese (figuras 28 a 30).

Figura 28 — Espectro de massas referente ao peptídeo EV0410. Confirmação do material obtido por espectrometria de massas em aparelho Bruker injeção *ion trap*, modo *elektrospray* positivo. Sequência do peptídeo: MAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQE RA-NH<sub>2</sub> e massa molar de 3047,24 g.mol<sup>-1</sup>



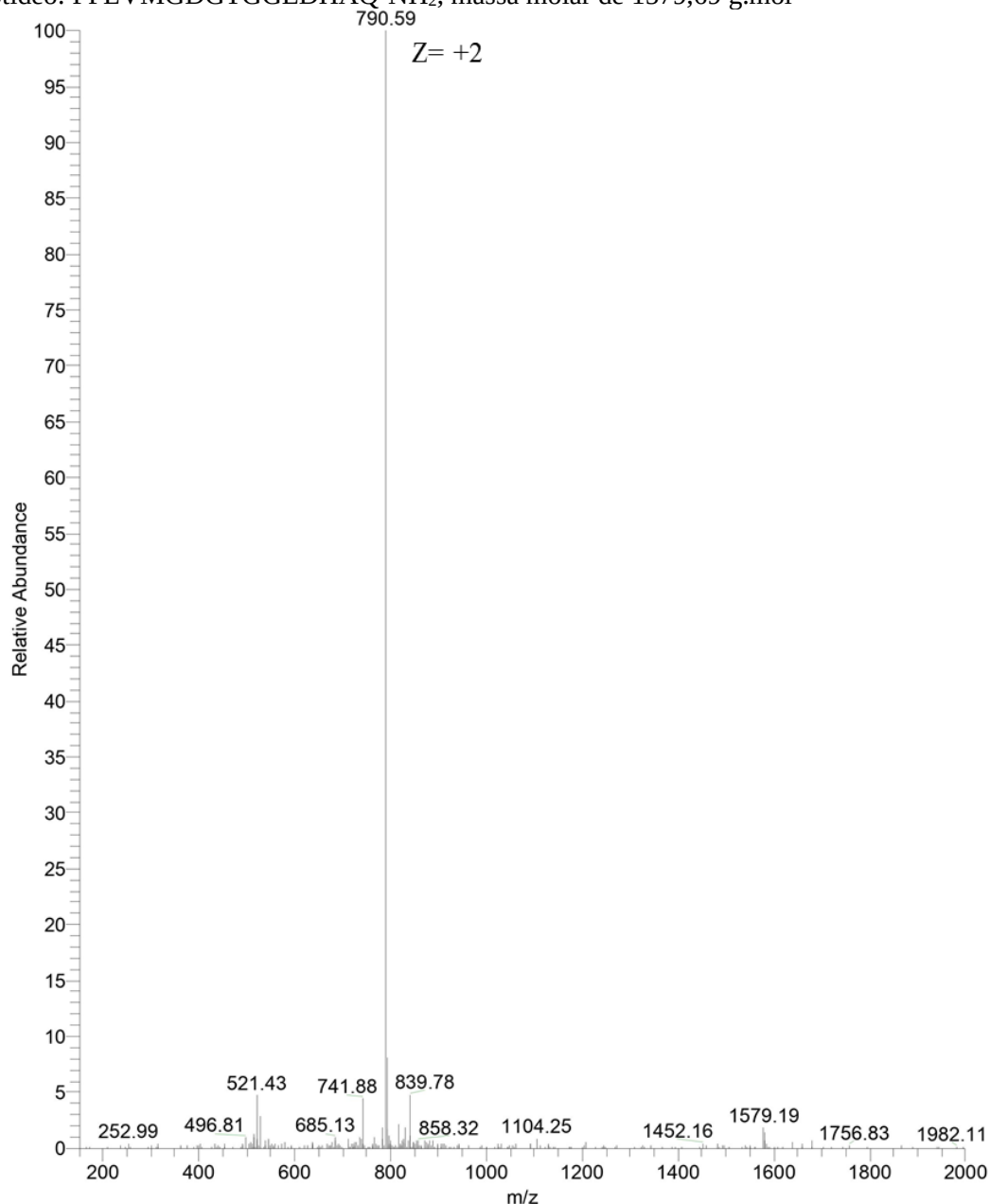
Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Figura 29 — Espectro de massas referente ao peptídeo WC2013. Confirmação do material obtido por espectrometria de massas em aparelho Bruker injeção *ion trap*, modo *eletrospray* positivo. Sequência do peptídeo: AQVMLYGSYALGLSLPS-NH<sub>2</sub>, massa molar de 1769,07 g.mol<sup>-1</sup>



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

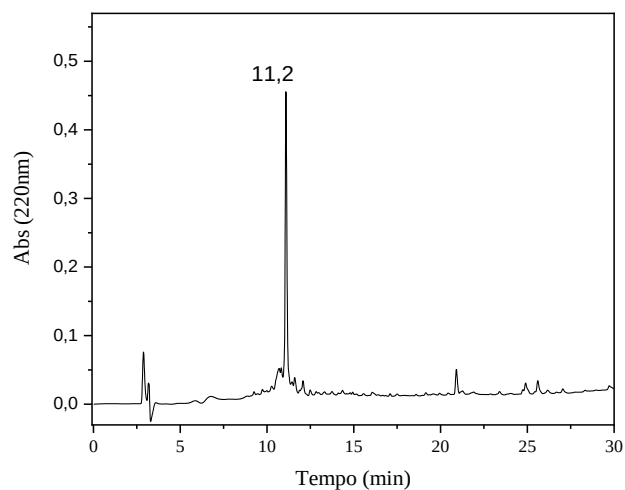
Figura 30 — Espectro de massas referente ao peptídeo WC2025. Confirmação do material obtido por espectrometria de massas em aparelho Bruker injeção *ion trap*, modo *eletrospray* positivo. Sequência do peptídeo: PPLVMGDGTGGEDHAQ-NH<sub>2</sub>, massa molar de 1579,69 g.mol<sup>-1</sup>



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

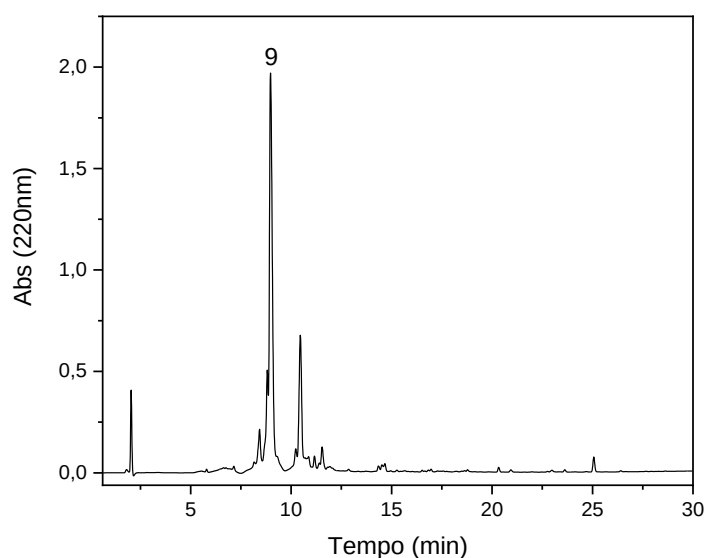
Os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos foram obtidos por CLAE. Os peptídeos EV0410 e WC2025 apresentaram tempo de retenção de 11,2 min e 9 min respectivamente (figura 31 e 32). Entretanto, para o peptídeo WC2013, não foi possível identificar o tempo de retenção, visto o perfil cromatográfico (Figura 33) e, assim, procedeu-se a purificação do material, seguida de identificação do pico de interesse por espectrometria de massas.

Figura 31 — Perfil cromatográfico do material bruto do EV0410 obtido após a clivagem para separação da resina. O material bruto foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência a um gradiente de 5 a 95 % de solvente B por 30 min a fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de retenção para o peptídeo EV0410 é de 11,2 minutos



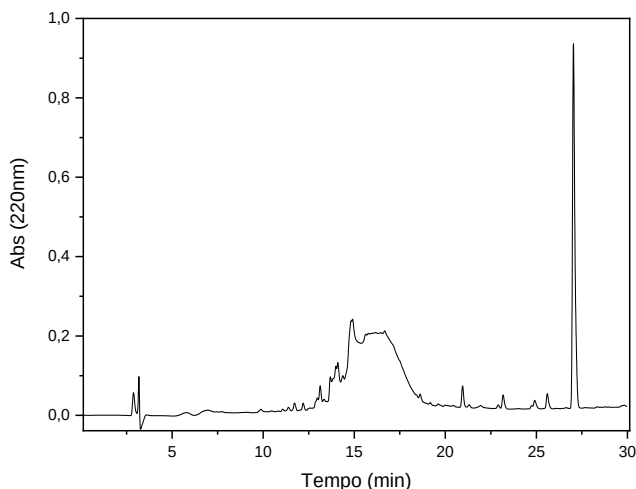
Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Figura 32 — Perfil cromatográfico do material bruto do WC2025 obtido após a clivagem para separação da resina. O material bruto foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência a um gradiente de 5 a 95 % de solvente B por 30 min a fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de retenção para o peptídeo WC2025 é de 9 minutos



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

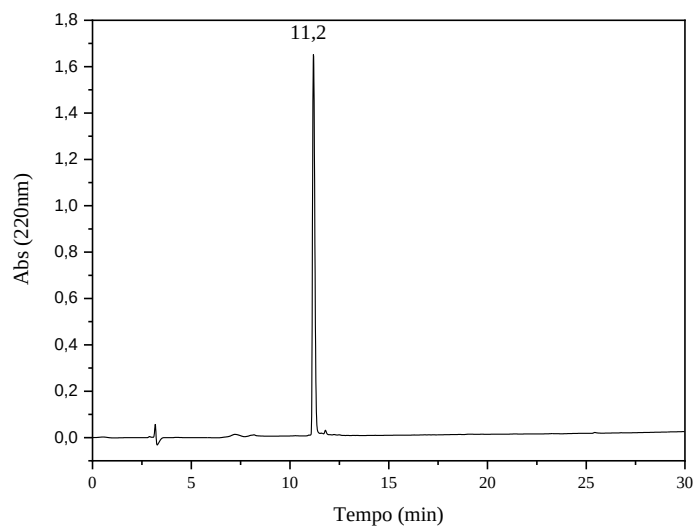
Figura 33 — Perfil cromatográfico do material bruto do WC2013 obtido após a clivagem para separação da resina. O material bruto foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência a um gradiente de 5 a 95 % de solvente B por 30 min a fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de retenção para o peptídeo WC2013 precisou ser investigado devido à dificuldade em identificar qual pico pertencia ao material de interesse



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

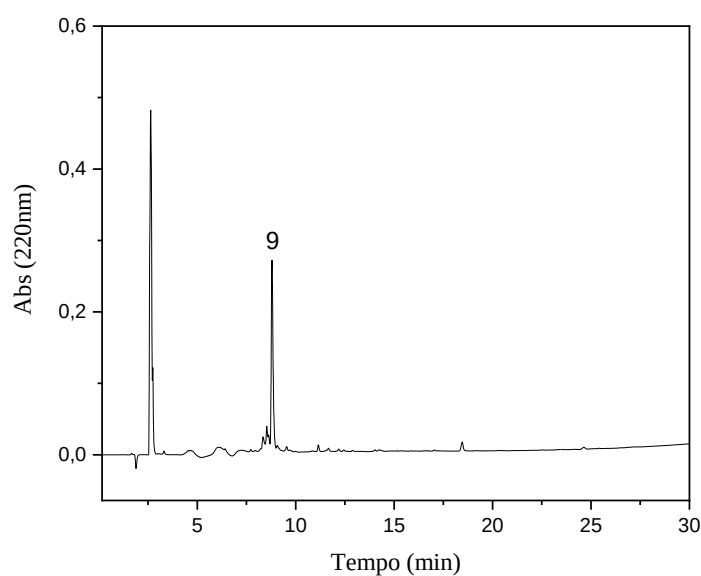
Os peptídeos EV0410 e WC2025 foram purificados em sistema CLAE semi-preparativo e as frações obtidas foram avaliadas em CLAE analítico (Figuras 34 e 35), obtendo-se o rendimento final igual a 12 e 10 mg dos peptídeos EV0410 e WC2025, respectivamente, e grau de pureza superior a 95% (Tabela 6). Devido à baixa solubilidade do peptídeo WC2013 em H<sub>2</sub>O e acetonitrila, em função da presença de resíduos de aminoácidos com cadeia lateral não polar leucina, valina, fenilalanina e isoleucina, houve a formação de folhas betas e, conseqüentemente, agregação das moléculas (MUELLER; BAUMRUCK; ZHDANOVA; TIETZE, 2020; PARADÍS-BAS; TULLA-PUCHE; ALBERICIO, 2016). Outros métodos de purificação deverão ser testados no futuro para que este peptídeo possa ter suas propriedades imunogênicas caracterizadas.

Figura 34 — Perfil cromatográfico do material purificado do EV0410 obtido após purificação em sistema CLAE semi-preparativo. O material purificado foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência a um gradiente de 5 a 95 % de solvente B por 30 min a fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de retenção para o peptídeo EV0410 é de 11,2 minutos



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Figura 35 — Perfil cromatográfico do material purificado do WC2025 obtido após purificação em sistema CLAE semi-preparativo. O material purificado foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência a um gradiente de 5 a 95 % de solvente B por 30 min a fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de retenção para o peptídeo WC2025 é de 9 minutos



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Tabela 4 — Condições utilizadas no processo de purificação dos peptídeos EV0410 e WC2025 em CLAE semi-preparativo, as massas e purezas obtidas. Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

|        | Peptídeo                         | Semi-preparativo   | Massa | Pureza |
|--------|----------------------------------|--------------------|-------|--------|
| EV0410 | MAQAVSSAEGGSRAALEATE             | 15-45 % solvente B | 12 mg | >95 %  |
|        | AAERAEQERA-NH <sub>2</sub>       |                    |       |        |
| WC2025 | PPLVMGDGTGGEDHAQ-NH <sub>2</sub> | 10-45 % solvente B | 10 mg | >95 %  |

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

#### 4.6 Imunização de camundongos BALB/c com uma mistura dos peptídeos EV0410 e WC2025

A LV canina é uma doença grave que afeta muitos cães, principalmente, em áreas endêmicas. Nestes locais, os animais estão sob risco de se infectarem pela picada do inseto *Phlebotominae*. Associado às condições climáticas adequadas para a proliferação do vetor e domesticidade desses mamíferos, o aparecimento de casos caninos precedem os casos de LV humana (DANTAS-TORRES; SOLANO-GALLEG0; BANETH; RIBEIRO *et al.*, 2012). Um fator preocupante relacionado à infecção canina é o grande número de casos assintomáticos, tendo em média 10% dos cães em áreas endêmicas, que varia de acordo com a localidade, como por exemplo, 0,4% na França e 19% na Grécia (ATHANASIOU; KONTOS; SARIDOMICHELAKIS; RALLIS *et al.*, 2012; MATTIN; SOLANO-GALLEG0; DHOLLANDER; AFONSO *et al.*, 2014). No Brasil, os números de casos de LV canina são elevados, por exemplo, em Pernambuco, cerca de 42% dos animais testados apresentaram sororeatividade para leishmanioses, com 43% não apresentando sintomas da parasitose (EVARISTO; SEVÁ; OLIVEIRA; SILVA *et al.*, 2020; FREITAS; NUNES-PINHEIRO; ABREU, 2018).

Desta forma, várias proteínas foram investigadas ao longo dos anos quanto a sua imunogenicidade, KMP-11 (DIKHIT; KUMAR; DAS; DEHURY *et al.*, 2017), Cisteino protease (DUARTE; QUEIROZ; TOSTA; CARVALHO *et al.*, 2015), LiHyp1 (MARTINS; CHÁVEZ-FUMAGALLI; COSTA; CANAVACI *et al.*, 2013), LiHyD (LAGE; MARTINS; DUARTE; COSTA *et al.*, 2016), NH3 (NICO; CLASER; BORJA-CABRERA; TRAVASSOS *et al.*, 2010), GP63 (KAUR; SOBTI; KAUR, 2011), LACK (KEDZIERSKA; CURTIS; VALKENBURG; HATTON *et al.*, 2012), A2 (FERNANDES; COSTA; COELHO; MICHALICK *et al.*, 2008) entre outras, como forma de prevenção tanto da LV humana quanto canina, mas poucas avançaram para os ensaios clínicos (DUTHIE; REED, 2017) e chegaram ao mercado.

Este estudo buscou desenvolver uma vacina de múltiplos epítomos a partir de duas proteínas hipotéticas de *L. infantum*, LC06 e LC36, que utilizando estratégias de vacinologia reversa, mostraram-se reativos para soros de cães infectados com *L. infantum*, sendo capazes de diferenciar animais positivos de negativos para o parasita (LIMA, 2015b; NOGUEIRA; DEL CISTIA; URBACZEK; JUSI *et al.*, 2018). Consequentemente, esses resultados comprovam a antigenicidade dessas proteínas, além de indicar que elas são expressas durante a doença e são relevantes para o sistema imunológico do hospedeiro (FERNANDES; COELHO; MACHADO-COELHO; GRIMALDI *et al.*, 2012). Adicionalmente, é sabido que proteínas antigênicas apresentam grande potencial imunogênico (CRUMPTON, 1974).

Devido às dificuldades de expressar as proteínas em células bacterianas, optou-se pela realização da síntese química dos peptídeos acima descritos, derivados tanto da proteína LC36 quanto da LC06, os quais foram utilizados nos ensaios a seguir de imunização de camundongos, avaliação de resposta humoral e proteção frente ao desafio com *L. infantum*.

#### **4.6.1 Resposta humoral**

Para a determinação da resposta humoral, em camundongos BALB/c, grupos contendo cinco animais cada foram submetidos à imunização via subcutânea. O primeiro grupo recebeu PBS; o segundo grupo recebeu o adjuvante Saponina; o terceiro recebeu os peptídeos EV0410 (75 ug) e WC2025 (75 ug); e o quarto recebeu o adjuvante Saponina associados aos peptídeos EV0410 (75ug) e WC2025 (75 ug), todos dissolvidos em PBS e tendo 100 µL a dose. O esquema de imunização foi realizado nos dias 0, 14 e 21 e, no sétimo dia após a terceira imunização, os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para obtenção do soro e determinação da produção e níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a contra os antígenos testados. Três ensaios de ELISA foram realizados (ver Material e Métodos, item 3.25), sendo o primeiro referente à combinação dos peptídeos EV0410 (10 µg.mL<sup>-1</sup>) e WC2025 (10 µg.mL<sup>-1</sup>) adsorvidos aos poços de placas de microtitulação (Figura 36), enquanto nos outros dois ensaios, os peptídeos EV0410 (Figura 37) e WC2025 (Figura 38) foram adsorvidos individualmente.

Na figura 36, verifica-se que houve produção de IgG (OD<sub>450nm</sub> 0,99) significativamente maior (p<0,01) nos animais imunizados com os antígenos e o adjuvante saponina quando comparado aos grupos controles (OD<sub>450nm</sub> 0,12). No entanto, nas figuras 37 e 38, verifica-se que a maior produção de anticorpos se refere apenas ao peptídeo EV0410 (OD<sub>450nm</sub> 1) uma vez que a produção de IgG específica para WC2025 foi baixa (OD<sub>450nm</sub> 0,17).

A produção maior de IgG antígeno-específico no grupo vacinado, se comparada ao controle, demonstra a imunogenicidade da vacina peptídica EV0410/WC2025 como observado em outros estudos (AGALLOU; ATHANASIOU; KOUTSONI; DOTSIKA *et al.*, 2014; DIAS; MARTINS; RIBEIRO; RAMOS *et al.*, 2018; DIAS; RIBEIRO; MARTINS; LAGE *et al.*, 2018; MARTINS; DUARTE; CHAVEZ-FUMAGALLI; MENEZES-SOUZA *et al.*, 2015; MARTINS; LAGE; DUARTE; CARVALHO *et al.*, 2017; NICO; CLASER; BORJA-CABRERA; TRAVASSOS *et al.*, 2010).

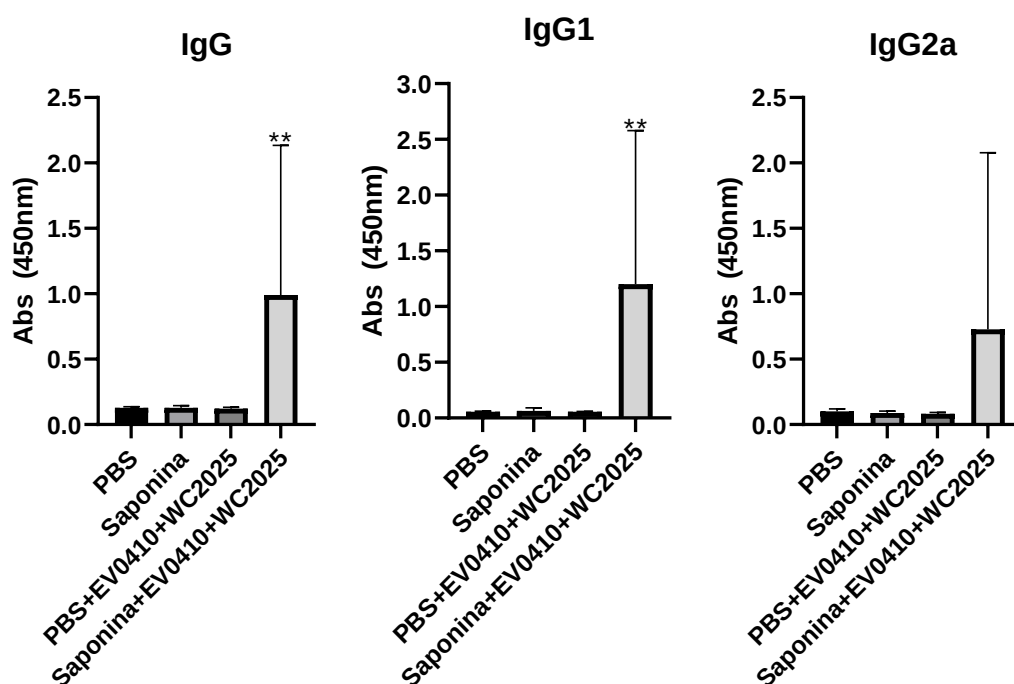
Quanto à produção de IgG1, seus níveis são mais elevados no grupo imunizado com a formulação, sendo seu título inferior para o peptídeo WC2025 (OD<sub>450nm</sub> 0,14). No entanto, os níveis de IgG2a obtidos não apresentaram diferenças significativas em relação aos demais grupos, exceto para o peptídeo WC2025 (OD<sub>450nm</sub> 0,15), no qual o grupo imunizado com a formulação Saponina+EV0410+WC2025 foi estatisticamente diferente dos grupos controles (OD<sub>450nm</sub> 0,1), apesar de ter apresentado baixos níveis de produção. Pode-se observar que houve desenvolvimento tanto de resposta Th1 quanto Th2, isso pode ser concluído pelas subclasses produzidas, visto que a presença de IgG1 e IgG2a está ligada à resposta Th2 e Th1, respectivamente (GERMANN; GATELY; SCHOENHAUT; LOHOFF *et al.*, 1993; SNAPPER; PAUL, 1987; STEVENS; BOSSIE; SANDERS; FERNANDEZ-BOTRAN *et al.*, 1988). Apesar de o índice elevado de IgG1, indicativo de polarização da resposta Th2, estar associado à susceptibilidade às leishmanioses, trabalhos anteriores apontam que o desenvolvimento de resposta Th2 no início da infecção estaria ligado ao desenvolvimento de células T CD8<sup>+</sup> de memória, contribuindo, assim, para proteção contra o parasita no modelo visceral (AGALLOU; SMIRLIS; SOTERIADOU; KARAGOUNI, 2012; STAGER; SMITH; KAYE, 2000).

Além disso, a obtenção de ambas as respostas Th1/Th2, diferentemente do que é observado para LC, é interessante para LV, pois tanto em estudos com camundongos quanto com humanos há indicativo de que células T CD4 reguladoras (Treg) seriam responsáveis pela susceptibilidade à doença (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001; KARP; EL-SAFI; WYNN; SATTI *et al.*, 1993; MAZUMDAR; ANAM; ALI, 2004; MURPHY; WILLE; VILLEGAS; HUNTER *et al.*, 2001; STAGER; SMITH; KAYE, 2000). Importante mencionar que o tipo de balanço Th1/Th2 aqui obtido pode ser consequência do adjuvante utilizado, visto que a saponina permite o desenvolvimento de ambas as respostas, apesar de ter sido relatado a sua predominância em estimular a resposta Th1 (KENSIL, 1996; TIZARD, 2020).

Os adjuvantes do tipo saponina são substâncias extraídas de plantas e são caracterizados como surfactantes, uma vez que são anfipáticos, possuindo porção lipofílica e hidrofílica (BARBOSA, 2014). A atividade adjuvante desses compostos está ligada a essa característica, pois são capazes de interagir com a membrana plasmática, na região da aplicação, e causar lise celular devido à formação de complexos com o colesterol e consequente formação de poros. Assim, o mecanismo de ação se dá por meio do dano e liberação de moléculas relacionadas a dano celular (DAMPs), que se ligam a receptores das células apresentadoras de antígenos, levando a ativação da via inflamatória (TIZARD, 2020). Desta forma, estimula-se a ação contra antígenos dependente ou independente de células T, além de induzir forte resposta citotóxica mediada por linfócitos, e por aumentar a produção de anticorpos, consequentemente, vem sendo utilizada como adjuvante veterinário (AIYER HARINI; ASHOK KUMAR; PRAVEEN KUMAR; SHIVAKUMAR, 2013; RAJPUT; HU; XIAO; ARIJO, 2007).

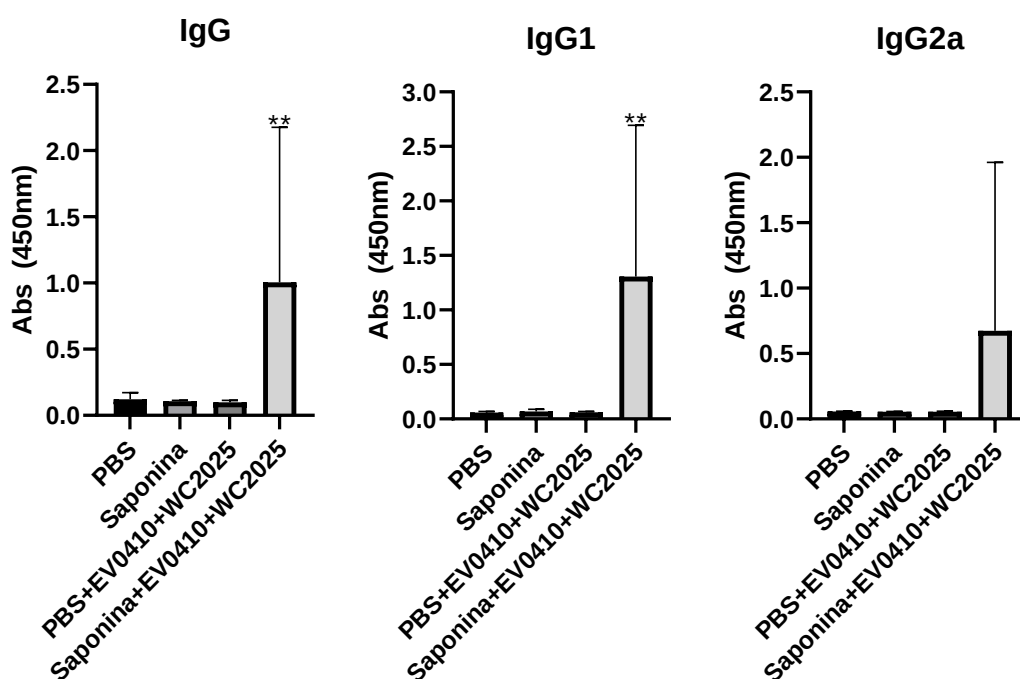
Curiosamente, ambos peptídeos, EV0410 e WC2025, foram identificados como epítomos de células B, EV0410 analisado por Lima (2015) e WC2025 neste trabalho. No entanto, os camundongos imunizados com PBS+ EV04/WC2025 não apresentaram produção de anticorpos, o que pode ser justificado pela baixa estabilidade dessas moléculas em um ambiente biológico, não havendo tempo hábil para que o sistema imune reconhecesse esses epítomos para desencadear a resposta imune. Por outro lado, apesar de a saponina não ser capaz de proteger o peptídeo como outros adjuvante, por exemplo, lipossomas (STARK; ANDREAE; MOSGOELLER; EDETSBERGER et al., 2008), ela ainda assim gerou a produção de anticorpos nos camundongos.

Figura 36 — Resposta de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a contra EV0410 e WC2025 de *L. infantum*. Cada grupo de camundongo BALB/c (n= 5) recebeu três doses da formulação vacinal por via subcutânea, com intervalo de 15 dias entre a primeira e a segunda dose e intervalo de sete dias entre a segunda e a terceira dose. Sete dias após a terceira dose, o sangue dos animais foi coletado para obtenção do soro e determinação do título de anticorpo IgG, IgG1 e IgG2a por meio de ELISA indireto. Para esse ensaio, as placas de Elisa Nunc MaxiSorp™ foram sensibilizadas usando solução-tampão carbonato de sódio ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 9,5) contendo combinação dos peptídeos EV0410 ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e WC2025 ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os resultados representam os valores de absorvância de anticorpos conjugados com HRP (Abcam) e diluição de 1:100 do soro dos camundongos. Grupos: PBS (100  $\mu\text{L}$ ), Saponina (50  $\mu\text{g}$  de saponina/100 $\mu\text{L}$  em PBS), PBS+EV0410+WC2025 (75  $\mu\text{g}$  de cada peptídeo/100 $\mu\text{L}$  em PBS), Saponina+EV0410+WC2025 (75  $\mu\text{g}$  de cada peptídeo/100 $\mu\text{L}$  em PBS). A significância estatística foi determinada por ANOVA usando o teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95%. \*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à PBS, Saponina e PBS+Peptídeos ( $p < 0,01$ )



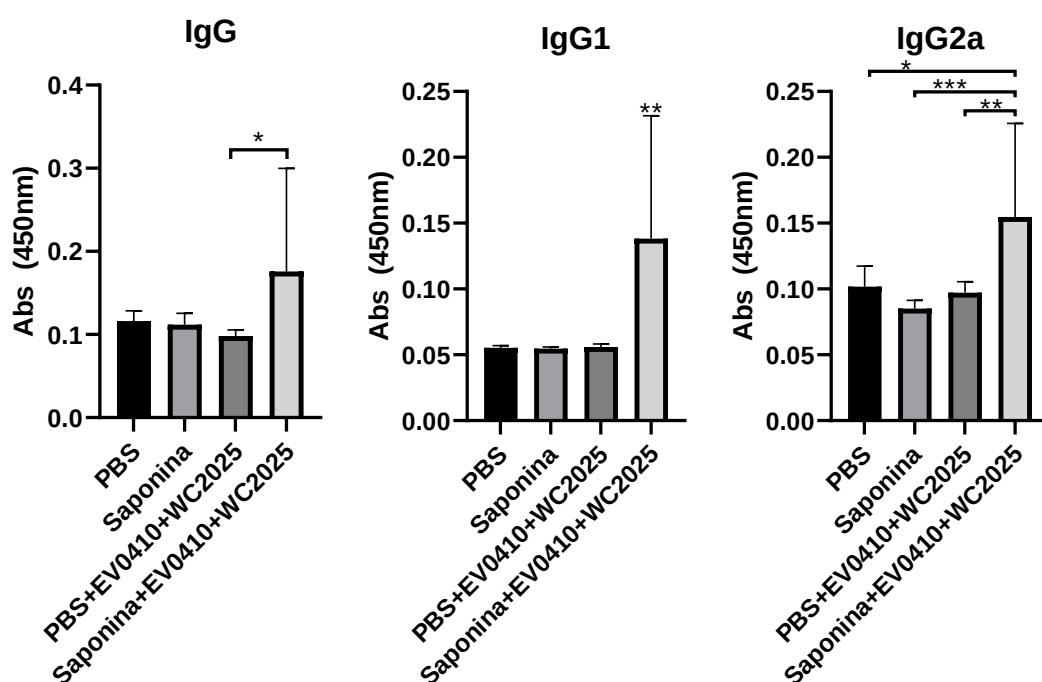
Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Figura 37 — Resposta de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a contra EV0410 de *L. infantum*. Cada grupo de camundongo BALB/c (n= 5) recebeu três doses da formulação vacinal por via subcutânea, com intervalo de 15 dias entre a primeira e a segunda dose e intervalo de sete dias entre a segunda e a terceira dose. Sete dias após a terceira dose, o sangue dos animais foi coletado para obtenção do soro e determinação do título de anticorpo IgG, IgG1 e IgG2a por meio de ELISA indireto. Para esse ensaio, as placas de Elisa Nunc MaxiSorp™ foram sensibilizadas usando solução-tampão carbonato de sódio (0,1 mol. L<sup>-1</sup>, pH 9,5) contendo o peptídeo EV0410 (10 µg.mL<sup>-1</sup>). Os resultados representam os valores de absorbância de anticorpos conjugados com HRP (Abcam) e diluição de 1:100 do soro dos camundongos. Grupos: PBS (100 µL), Saponina (50 µg de saponina/100µL em PBS), PBS+EV0410+WC2025 (75 µg de cada peptídeo/100µL em PBS), Saponina+EV0410+WC2025 (75 µg de cada peptídeo/100µL em PBS). A significância estatística foi determinada por ANOVA usando o teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95%. \*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação entre PBS, Saponina e PBS+Peptídeos (p < 0,01)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Figura 38 — Resposta de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a contra WC2025 de *L. infantum*. Cada grupo de camundongo BALB/c ( $n=5$ ) recebeu três doses da formulação vacinal por via subcutânea, com intervalo de 15 dias entre a primeira e a segunda dose e intervalo de sete dias entre a segunda e a terceira dose. Sete dias após a terceira dose, o sangue dos animais foi coletado para obtenção do soro e determinação do título de anticorpo IgG, IgG1 e IgG2a por meio de ELISA indireto. Para esse ensaio, as placas de Elisa Nunc MaxiSorp™ foram sensibilizadas usando solução-tampão carbonato de sódio ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 9,5) contendo o peptídeo WC2025 ( $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os resultados representam os valores de absorbância de anticorpos conjugados com HRP (Abcam) e diluição de 1:100 do soro dos camundongos. Grupos: PBS (100  $\mu\text{L}$ ), Saponina (50  $\mu\text{g}$  de saponina/100 $\mu\text{L}$  em PBS), PBS+EV0410+WC2025 (75  $\mu\text{g}$  de cada peptídeo/100 $\mu\text{L}$  em PBS), Saponina+EV0410+WC2025 (75  $\mu\text{g}$  de cada peptídeo/100 $\mu\text{L}$  em PBS). A significância estatística foi determinada por ANOVA usando o teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95%. Diferença estatisticamente significativa (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ )



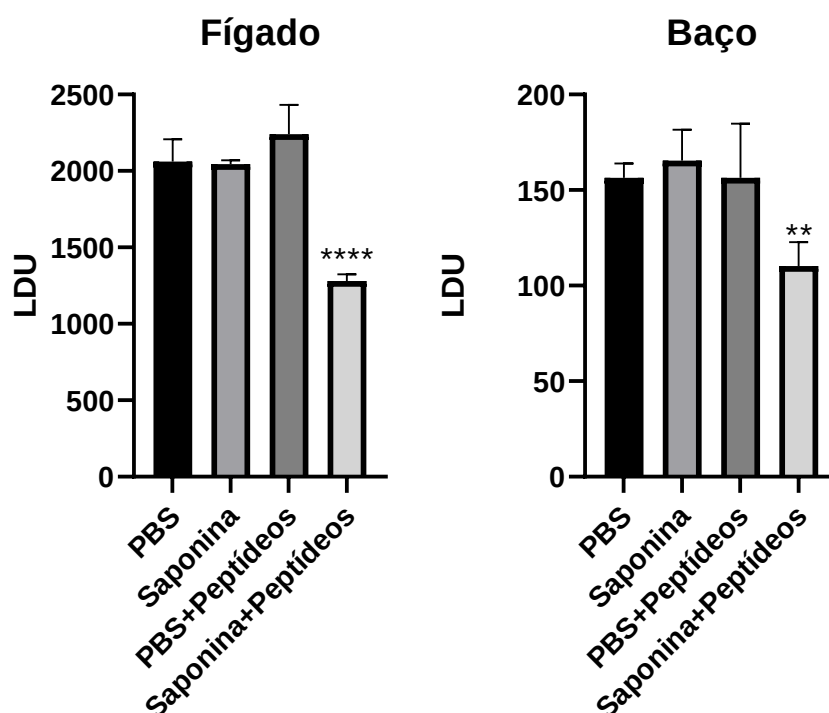
Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

#### 4.6.2 Carga Parasitária

Metade dos animais imunizados foram desafiados intraperitonealmente com  $1 \times 10^8$  promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de crescimento, para avaliar a proteção gerada pela imunização com a formulação Saponina+EV0410+WC2025. Após quinze dias de infecção, os animais foram eutanasiados para que se pudesse determinar a carga parasitária no baço e no fígado. Neste estudo, é possível observar reduções estatisticamente significativas entre o grupo vacinado com Saponina+EV0410+WC2025 e os grupos controles (Figura 39). Neste contexto, os animais imunizados com os antígenos e o adjuvante

apresentaram redução na carga parasitária de 37,8% no fígado, enquanto, no baço, a redução foi de 27,6% ao se comparar ao grupo PBS.

Figura 39 — Determinação da carga parasitária. Índice de LDU (número de amastigotas de *Leishmania* por 1000 células nucleadas por peso do órgão) em camundongos BALB/c imunizados e, então, desafiados via intraperitoneal com  $1 \times 10^8$  *L. infantum* para serem eutanasiados após quinze dias. Redução de 37,8 % do parasita no fígado e 27,6 % no baço. Diferença estatisticamente significativa em relação à PBS, Saponina e PBS+Peptídeos (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Há estudos avaliando formulações vacinais contendo peptídeos e saponina como adjuvante. Martins et al. (2015) observaram o desenvolvimento tanto de resposta Th1 quanto Th2 em animais imunizados com epítomos da proteína LiHyV de *L. infantum* para linfócitos T CD8<sup>+</sup> (AGQSVPSNL e VGIKNTAALFVLNATAI). Assim como neste trabalho, os autores observaram menor redução na carga parasitária em relação ao grupo controle (salina), mas estatisticamente significativa; por outro lado, os animais que receberam a proteína LiHyV recombinante como imunizante apresentaram redução significativamente maior que o grupo peptídeo/saponina. Quanto à imunogenicidade, é possível "brincar" com outros adjuvantes para potencializar a capacidade imunogênica do antígeno. Há diversas classes de adjuvantes para serem exploradas, mas algumas características devem ser consideradas para cada tipo de infecção a ser estudada (REED; ORR; FOX, 2013). A saponina foi escolhida neste

trabalho por ser usada para fins veterinários (WANG, 2021), por ser capaz de desencadear um resposta Th1 (RAJPUT; HU; XIAO; ARIJO, 2007) e por já ter sido alvo de estudo em vacinas para *Leishmania* (CHÁVEZ-FUMAGALLI; COSTA; OLIVEIRA; RAMÍREZ *et al.*, 2010; DUARTE; LAGE; MARTINS; COSTA *et al.*, 2016; LAGE; MARTINS; DUARTE; COSTA *et al.*, 2016). Embora a formulação (EV04/WC2025+saponina) aqui investigada tenha apresentado resultados relevantes para a produção de uma resposta protetora, testar outros adjuvantes poderá constituir-se em uma nova estratégia para melhorar a proteção contra a infecção por *L. infantum*. Peters et al. (2012) avaliaram duas formulações vacinais utilizando como adjuvante monofosforil lipídio A ou glicopiranosil lipídio A, observando aumento na produção de INF- $\gamma$  e redução da carga parasitária após desafio.

Ainda, é possível trabalhar com vacina contendo múltiplos epítomos como forma de aumentar as chances de reconhecimento pelo sistema imune e, desta forma, desenvolver uma proteína quimérica, como por exemplo, Dias *et al.* (2018) que expressaram uma quimera a partir de epítomos de três antígenos de *Leishmania*, as proteínas LiHyp, SGT e PHB. Apesar de estar numa nova estrutura, a “nova” proteína foi reconhecida por anticorpos de cães infectados pela doença, assim como por soro de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes individualmente, não interferindo no sistema de reconhecimento. Após ensaio de imunização tendo saponina como adjuvante, observaram mix de resposta Th1 e Th2, porém tendo os níveis de Th1 superior a Th2. Após o desafio, observaram redução de 91% na carga parasitária no baço dos camundongos infectados. Da mesma forma, Valiki *et al.* (2018; 2020) construíram uma proteína a partir de epítomos de quatro antígenos de *L. infantum*, as proteínas LiHy, H1, SMT e LSAP. Destaca-se a adição de “adjuvantes” à porção N e C terminal da proteína, por meio de fragmentos das proteínas RpfE e RpfB de *Mycobacterium tuberculosis* (também presente no adjuvante completo de Freund) como forma de embutir o adjuvante no próprio antígeno (*built-in adjuvant*). Tal estratégia permitiu que a proteína não necessitasse de adjuvante na formulação, visto que ao comparar os grupos imunizados com e sem adjuvante não houve diferenças significativas, tanto na redução da carga parasitária (88,8 %) como na produção de citocinas e imunoglobulinas. Ainda, Nico *et al.* (2010) obtiveram reduções de 88 % na carga parasitária de BALB/c infectados com *L. infantum* utilizando um peptídeo de 115 resíduos com sete epítomos, sendo três deles para MHC-II e quatro para células B. Isto posto, não nos escapa a possibilidade de ampliar o número de epítomos derivados de LC06 e LC36 em novos estudos e, assim, obter uma resposta imune protetora mais robusta.

Um outro desafio de trabalhar com vacinas à base de peptídeos reside na questão da manutenção de estabilidade, já que após a administração, estes podem ser degradados por inúmeras proteases, interferindo negativamente no processo de formação de uma resposta imune (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016). Assim, pode-se aplicar na continuidade deste trabalho estratégias que visem ampliar a estabilidade e imunogenicidade desses peptídeos, como adição de outras estruturas na porção amino e carboxi-terminal, como grupos amida, acetil, lipídios e carboidratos (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016). Cooper *et al.* (1997), utilizando esta abordagem, adicionou sequências flanqueadoras derivadas da proteína GCN4 de *Saccharomyces cerevisiae* ao peptídeo p145 derivado da proteína M de *Streptococcus* para promover uma alteração conformacional à  $\alpha$ -hélice, consequentemente, melhorar a imunogenicidade do peptídeo modificado. Outras estratégias referem-se, ainda, à ciclização, muito testada em desenvolvimento de vacinas para HIV (MCGAUGHEY; CITRON; DANZEISEN; FREIDINGER *et al.*, 2003), e adição de ligações químicas artificiais entre resíduos de aminoácidos distintos para reduzir ação de proteases e ainda aumentar a afinidade entre a ligação anticorpo - antígeno (BIRD; IRIMIA; OFEK; KWONG *et al.*, 2014).

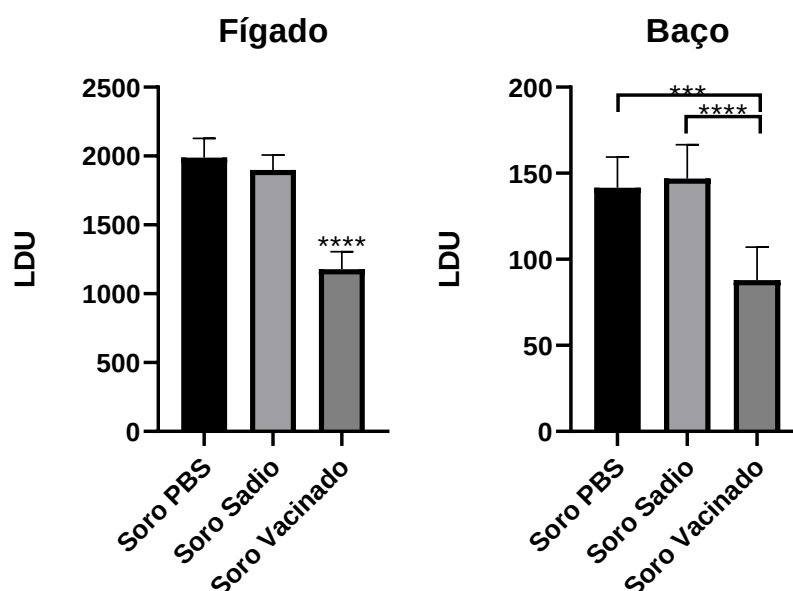
#### 4.7 Imunização passiva

Após a obtenção do soro dos camundongos do ensaio de imunogenicidade, novos grupos compostos por sete camundongos cada receberam, via intraperitoneal, 100  $\mu$ L de soro diluído (1:2 em PBS), e o sistema do complemento foi inativado a 56°C por 30 minutos para avaliação da capacidade protetora dos anticorpos. Observa-se na figura 40 que, após quinze dias de infecção, houve redução na carga parasitária nos dois órgãos avaliados, tendo 40,9% de redução no fígado e 38,4% no baço.

Ao se tratar da leishmaniose, o papel dos anticorpos no combate a infecção é controverso, apesar de ser um critério de avaliação em estudos de desenvolvimento de vacinas (BEATTIE; PELTAN; MAROOF; KIRBY *et al.*, 2010; NYLÉN; GAUTAM, 2010; RONET; VOIGT; HIMMELRICH; DOUCEY *et al.*, 2008; SINGH; KUMARI; SINGH, 2002). Aqui, observamos a redução da carga parasitária em camundongos BALB/c tratados previamente com o soro e, então, infectados com *L. infantum*. Em contrapartida, experimento similar realizado por McNolty *et al.* (2021) não apresentou resultado similar, uma vez que o uso do soro em camundongos favoreceu a infecção por *L. infantum*. Entretanto, vale ressaltar que os autores usaram soro de animais curados de leishmaniose cutânea (*L. mexicana*) para realizar a transferência passiva no combate a LV.

Desta forma, tais resultados abrem a possibilidades de realização de novos ensaios no estudo do papel dos anticorpos no combate às leishmanioses (imunoterapia), considerando o potencial para desenvolvimento de anticorpos monoclonais para fins de imunoterapia de cães diagnosticados com a doença.

Figura 40 — Determinação da carga parasitária. Índice de LDU (número de amastigotas de *Leishmania* por 1000 células nucleadas por peso do órgão) em camundongos BALB/c que receberam soro inativado de camundongos imunizados com PBS, camundongos sadios ou camundongos imunizados com a formulação vacinal. Quarenta e oito horas após receberem o soro, os animais foram desafiados via intraperitoneal com  $1 \times 10^8$  *L. infantum* para serem eutanasiados após quinze dias. Redução de 40,9% do parasita no fígado e 38,4 % no baço Diferença estatisticamente significativa (\*\*\*)  $p = 0,0001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

## 5 CONCLUSÃO

Apesar das diversas estratégias testadas, não foi possível expressar a proteína LC36, enquanto a sequência da ORF *lc06* não foi amplificada.

Análises in silico permitiram a identificação de 9 epítomos derivados da LC36 capazes de se ligar às células B. Entretanto, apenas dois foram selecionados para síntese, pois pertenciam ao fragmento já expresso anteriormente pelo grupo de pesquisa.

Devido a sua sequência de aminoácidos, o peptídeo WC2013 apresentou baixa solubilidade e não foi usado nos ensaios in vivo. No entanto, os peptídeos EV0410 e WC2025 foram sintetizados e purificados sem adversidades.

A vacina peptídica testada induziu resposta humoral em BALB/c, com predominância de IgG1. O peptídeo EV0410 apresentou imunodominância em relação ao WC2025.

A formulação (Saponina+Peptídeos) levou à proteção parcial contra *L. infantum*, havendo redução da carga parasitária de 37,8 % no fígado e 27,6 % no baço.

O soro dos animais imunizados com os peptídeos protegeu, parcialmente, animais não imunizados e desafiados com o parasita, com redução da carga parasitária de 40,9% no fígado e 38,4 % no baço.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAK, S.; LOUZIR, H.; TIMM, J.; BLEL, L. *et al.* Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against Leishmania major infection in BALB/c mice. **Microbiology (Reading)**, 141 ( Pt 7), p. 1585-1592, Jul 1995.

AGALLOU, M.; ATHANASIOU, E.; KOUTSONI, O.; DOTSIKA, E. *et al.* Experimental Validation of Multi-Epitope Peptides Including Promising MHC Class I- and II-Restricted Epitopes of Four Known Leishmania infantum Proteins. **Front Immunol**, 5, p. 268, 2014.

AGALLOU, M.; MARGARONI, M.; KARAGOUNI, E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of Leishmania infantum KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, 29, n. 31, p. 5053-5064, Jul 12 2011.

AGALLOU, M.; SMIRLIS, D.; SOTERIADOU, K. P.; KARAGOUNI, E. Vaccination with Leishmania histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, 30, n. 34, p. 5086-5093, Jul 20 2012.

AIYER HARINI, P.; ASHOK KUMAR, H. G.; PRAVEEN KUMAR, G.; SHIVAKUMAR, N. An Overview of Immunologic Adjuvants - A Review. **Journal of Vaccines and Vaccination**, 4, 2013.

ALVAR, J.; CROFT, S. L.; KAYE, P.; KHAMESIPOUR, A. *et al.* Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, 31 Suppl 2, p. B244-249, Apr 2013.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, 7, n. 5, May 2012.

ANAND, S.; MADHUBALA, R. Genetically Engineered Ascorbic acid-deficient Live Mutants of Leishmania donovani induce long lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, 5, Jun 2015.

ANDERSEN, P. H.; NIELSEN, M.; LUND, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Science**, 15, n. 11, p. 2558-2567, Nov 2006.

ATHANASIOU, L. V.; KONTOS, V. I.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; RALLIS, T. S. *et al.* A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. **Acta Trop**, 122, n. 3, p. 291-295, Jun 2012.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian Journal of Medical Research**, 119, n. 6, p. 238-258, Jun 2004.

BARBIERI, C. L. A.; COUTO, M. T.; AITH, F. M. A. Culture versus the law in the decision not to vaccinate children: meanings assigned by middle-class couples in São Paulo, Brazil. **Cadernos de saude publica**, 33, p. e00173315, 2017.

BARBOSA, A. P. Saponins as immunoadjuvant agent: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 8: 1049-10557 p. 2014.

BEATTIE, L.; PELTAN, A.; MAROOF, A.; KIRBY, A. *et al.* Dynamic imaging of experimental Leishmania donovani-induced hepatic granulomas detects Kupffer cell-restricted antigen presentation to antigen-specific CD8 T cells. **PLoS Pathog**, 6, n. 3, p. e1000805, Mar 2010.

BEAUMIER, C. M.; GILLESPIE, P. M.; HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. **Transl Res**, 162, n. 3, p. 144-155, Sep 2013.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S. *et al.* The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **Journal of Experimental Medicine**, 194, n. 10, p. 1497-1506, Nov 2001.

BELKAID, Y.; VON STEBUT, E.; MENDEZ, S.; LIRA, R. *et al.* CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major. **J Immunol**, 168, n. 8, p. 3992-4000, Apr 15 2002.

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D. S.; VAN DER MEIDE, P. H.; SLAYTER, M. V. *et al.* Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with Leishmania major. **J Immunol**, 143, n. 1, p. 266-274, Jul 1989.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with Leishmania donovani. **Infect Immun**, 76, n. 3, p. 1003-1015, Mar 2008.

BIRD, G. H.; IRIMIA, A.; OFEK, G.; KWONG, P. D. *et al.* Stapled HIV-1 peptides recapitulate antigenic structures and engage broadly neutralizing antibodies. **Nat Struct Mol Biol**, 21, n. 12, p. 1058-1067, Dec 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasília: 2 p. 2016.

BRON, S.; MEIMA, R.; VAN DIJL, J. M.; WIPAT, A. *et al.* Molecular

Biology and Genetics of *Bacillus* species. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press, 1999.

BROWN, D. R.; REINER, S. L. Polarized helper-T-cell responses against *Leishmania major* in the absence of B cells. **Infection and Immunity**, 67, n. 1, p. 266-270, Jan 1999.

BRUHN, K. W.; BIRNBAUM, R.; HASKELL, J.; VANCHINATHAN, V. *et al.* Killed but Metabolically Active *Leishmania infantum* as a Novel Whole-Cell Vaccine for Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, 19, n. 4, p. 490-498, Apr 2012.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; VINHAS, V. *et al.* Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. **Bmc Infectious Diseases**, 5, Dec 2005.

CARNEIRO CASTRO COSTA, D. N.; MORALEJO BERMUDI, P. M.; COLEBRUSCO RODAS, L. A.; NUNES, C. M. *et al.* Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Revista De Saude Publica**, 52, 2018 2018.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; FERNÁNDEZ, L.; MORENO, J. *et al.* Pre-clinical antigenicity studies of an innovative multivalent vaccine for human visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, 11, n. 11, p. e0005951, Nov 2017.

CHIN, J. Control of communicable diseases manual. Washington, D.C: American Public Health Association 2000.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; COSTA, M. A.; OLIVEIRA, D. M.; RAMÍREZ, L. *et al.* Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. **Microbes Infect**, 12, n. 12-13, p. 967-977, Nov 2010.

COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; CARVALHO, F. A.; CHAVES, K. F. *et al.* Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. **Infect Immun**, 71, n. 7, p. 3988-3994, Jul 2003.

COELHO, V. T.; OLIVEIRA, J. S.; VALADARES, D. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. *et al.* Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 1, p. e1430, Jan 2012.

COOPER, J. A.; HAYMAN, W.; REED, C.; KAGAWA, H. *et al.* Mapping of conformational B cell epitopes within alpha-helical coiled coil proteins. **Mol Immunol**, 34, n. 6, p. 433-440, Apr 1997.

COSTA, C. H.; STEWART, J. M.; GOMES, R. B.; GARCEZ, L. M. *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, 66, n. 4, p. 334-337, Apr 2002.

COSTA, D. N. C. C.; CODEÇO, C. T.; BERMUDI, P. M. M.; RODAS, L. A. C. *et al.* Controle da leishmaniose visceral canina por eutanásia: estimativa de efeito baseado em inquérito e modelagem matemática. **Cadernos de Saúde Pública**, 36, p. e00221418, 2020.

COSTA, L. E.; GOULART, L. R.; PEREIRA, N. C.; LIMA, M. I. *et al.* Mimotope-based vaccines of *Leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. **PLoS One**, 9, n. 10, p. e110014, 2014.

CRAWFORD, A.; MACLEOD, M.; SCHUMACHER, T.; CORLETT, L. *et al.* Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. **J Immunol**, 176, n. 6, p. 3498-3506, Mar 2006.

CRUMPTON, M. J. Protein Antigens: The Molecular Bases of Antigenicity and Immunogenicity. In: SELA, M. (Ed.). **The Antigens**: Academic Press, 1974. v. 2, cap. 1, p. 1-78.

DAHL, M. K.; MANSON, M. D. INTERSPECIFIC RECONSTITUTION OF MALTOSE TRANSPORT AND CHEMOTAXIS IN *ESCHERICHIA-COLI* WITH MALTOSE-BINDING PROTEIN FROM VARIOUS ENTERIC BACTERIA. **Journal of Bacteriology**, 164, n. 3, p. 1057-1063, 1985 1985.

DAKAPPAGARI, N. K.; DOUGLAS, D. B.; TRIOZZI, P. L.; STEVENS, V. C. *et al.* Prevention of mammary tumors with a chimeric HER-2 B-cell epitope peptide vaccine. **Cancer Research**, 60, n. 14, p. 3782-3789, Jul 15 2000.

DAKAPPAGARI, N. K.; PYLES, J.; PARIHAR, R.; CARSON, W. E. *et al.* A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2 B cell epitope peptide vaccine mediates superior antitumor responses. **Journal of Immunology**, 170, n. 8, p. 4242-4253, Apr 15 2003.

DALSASS, M.; BROZZI, A.; MEDINI, D.; RAPPUOLI, R. Comparison of Open-Source Reverse Vaccinology Programs for Bacterial Vaccine Antigen Discovery. **Front Immunol**, 10, p. 113, 2019.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune((R)) vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Veterinary Parasitology**, 141, n. 1-2, p. 1-8, Oct 2006.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M. *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends Parasitol**, 28, n. 12, p. 531-538, Dec 2012.

DAS, A.; ALI, N. Vaccine Development Against *Leishmania donovani*. **Front Immunol**, 3, p. 99, 2012.

DEAK, E.; JAYAKUMAR, A.; CHO, K. W.; GOLDSMITH-PESTANA, K. *et al.* Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **European Journal of Immunology**, 40, n. 5, p. 1355-1368, May 2010.

DIAS, D. S.; MARTINS, V. T.; RIBEIRO, P. A. F.; RAMOS, F. F. *et al.* Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of a conserved *Leishmania* hypothetical protein against visceral leishmaniasis. **Parasitology**, 145, n. 6, p. 740-751, May 2018. Article.

DIAS, D. S.; RIBEIRO, P. A. F.; MARTINS, V. T.; LAGE, D. P. *et al.* Vaccination with a CD4(+) and CD8(+) T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from

*Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. **Translational Research**, 200, p. 18-34, Oct 2018.

DIKHIT, M. R.; KUMAR, A.; DAS, S.; DEHURY, B. *et al.* Identification of Potential MHC Class-II-Restricted Epitopes Derived from. **Front Immunol**, 8, p. 1763, 2017.

DING, C. C.; MA, J. F.; DONG, Q. L.; LIU, Q. Live bacterial vaccine vector and delivery strategies of heterologous antigen: A review. **Immunology Letters**, 197, p. 70-77, May 2018.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F.; AVINO, V. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasit Vectors**, 12, n. 1, p. 79, Feb 08 2019.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. Identifying candidate subunit vaccines using an alignment-independent method based on principal amino acid properties. **Vaccine**, 25, n. 5, p. 856-866, Jan 2007a.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **Bmc Bioinformatics**, 8, Jan 2007b.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. Bioinformatic approach for identifying parasite and fungal candidate subunit vaccines. **Open Vaccine J**, 1, n. 1, p. 4, 2008.

DUARTE, A.; QUEIROZ, A. T.; TOSTA, R.; CARVALHO, A. M. *et al.* Prediction of CD8+ Epitopes in *Leishmania braziliensis* Proteins Using EPIBOT: In Silico Search and In Vivo Validation. **PLoS One**, 10, n. 4, p. e0124786, 2015.

DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E. *et al.* A vaccine combining two *Leishmania braziliensis* proteins offers heterologous protection against *Leishmania infantum* infection. **Mol Immunol**, 76, p. 70-79, 08 2016.

DUTHIE, M. S.; REED, S. G. Not All Antigens Are Created Equally: Progress, Challenges, and Lessons Associated with Developing a Vaccine for Leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**, 24, n. 7, Jul 2017.

EL RIDI, R.; MAHROUS, A.; AFIFI, A.; MONTASH, M. *et al.* Human and murine humoral immune recognition of multiple peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde 3-P dehydrogenase is associated with resistance to Schistosomiasis. **Scandinavian Journal of Immunology**, 54, n. 5, p. 477-485, Nov 2001.

ESTEVA, L.; VARGAS, C.; VARGAS DE LEÓN, C. The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. **Math Biosci**, 293, p. 46-55, 11 2017.

EVARISTO, A. M. D. C.; SEVÁ, A. D. P.; OLIVEIRA, G. M. B.; SILVA, I. W. G. D. *et al.* Canine leishmaniasis in the semi-arid region of Pernambuco, northeastern Brazil: epidemiology, factors associated with seropositivity and spatial analysis. **Rev Bras Parasitol Vet**, 29, n. 2, p. e001120, 2020.

FERNANDES, A. P.; COELHO, E. A.; MACHADO-COELHO, G. L.; GRIMALDI, G. *et al.* Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Curr Opin Microbiol**, 15, n. 4, p. 476-485, Aug 2012.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M.; COELHO, E. A.; MICHALICK, M. S. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, 26, n. 46, p. 5888-5895, Oct 2008.

FISCHER, E.; OTTO, E. Synthese von Derivaten einiger Dipeptide. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, 36, n. 2, p. 2106-2116, 1903.

FIUZA, J. A.; GANNAVARAM, S.; SANTIAGO, H. D.; SELVAPANDIYAN, A. *et al.* Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. **Vaccine**, 33, n. 2, p. 280-288, Jan 2015.

FREITAS, J. C. C. D.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; ABREU, C. R. A. D. Geographical variation in clinical signs and prevalence of *Leishmania* sp. infection among dogs in Fortaleza, Ceará State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2018.

GERMANN, T.; GATELY, M. K.; SCHOENHAUT, D. S.; LOHOFF, M. *et al.* Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. **Eur J Immunol**, 23, n. 8, p. 1762-1770, Aug 1993.

GHALIB, H. W.; WHITTLE, J. A.; KUBIN, M.; HASHIM, F. A. *et al.* IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **J Immunol**, 154, n. 9, p. 4623-4629, May 1995.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, 20, n. 1-2, p. 59-66, Oct 2001.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. E. L. [American cutaneous leishmaniasis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, 36, n. 1, p. 71-80, 2003 Jan-Feb 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, 37, n. 4, p. 615-623, Apr 2004.

GOTO, Y.; CARTER, D.; REED, S. G. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. **Infection and Immunity**, 76, n. 9, p. 3967-3974, Sep 2008.

GOTO, Y.; COLER, R. N.; GUDERIAN, J.; MOHAMATH, R. *et al.* Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. **Infect Immun**, 74, n. 7, p. 3939-3945, Jul 2006.

GOTO, Y.; COLER, R. N.; REED, S. G. Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex. **Infection and Immunity**, 75, n. 2, p. 846-851, Feb 2007.

GRIMALDI, G.; TEVA, A.; DOS-SANTOS, C. B.; SANTOS, F. N. *et al.* Field trial of efficacy of the Leish-tec((R)) vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **Plos One**, 12, n. 9, Sep 2017.

HAILU, A.; DAGNE, D. A.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *In: Neglected Tropical Diseases - Sub-Saharan Africa*. Switzerland: Springer, Cham, 2016. cap. 1, p. 87-112.

HAJIGHAHRAMANI, N.; NEZAFAT, N.; ESLAMI, M.; NEGAHDARIPOUR, M. *et al.* Immunoinformatics analysis and in silico designing of a novel multi-epitope peptide vaccine against *Staphylococcus aureus*. **Infection Genetics and Evolution**, 48, p. 83-94, Mar 2017.

HANDMAN, E.; BUTTON, L. L.; MCMASTER, R. W. *Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. **Exp Parasitol**, 70, n. 4, p. 427-435, May 1990.

HANG, B.; PAN, J.; NI, D.; ZHENG, Q. *et al.* High-level production of aquaporin Z in *Escherichia coli* using maltose-binding protein/polyhistidine dual-affinity tag fusion system. **Process Biochemistry**, 51, n. 5, p. 599-606, May 2016.

HIMMELRICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J. A. *et al.* The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor beta 2-chain expression on CD4<sup>+</sup> T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. **J Immunol**, 161, n. 11, p. 6156-6163, Dec 1998.

HOLADAY, B. J.; SADICK, M. D.; WANG, Z. E.; REINER, S. L. *et al.* Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- and Th2-like cell lines. **J Immunol**, 147, n. 5, p. 1653-1658, Sep 1991.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiol Rev**, 29, n. 4, p. 813-835, Sep 2005.

ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; TRAN, H. T.; CIABATTINI, A. *et al.* Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. **J Bacteriol**, 183, n. 21, p. 6294-6301, Nov 2001.

JAAFARI, M. R.; BADIEE, A.; KHAMESIPOUR, A.; SAMIEI, A. *et al.* The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. **Vaccine**, 25, n. 32, p. 6107-6117, Aug 2007.

JAAFARI, M. R.; GHAFARIAN, A.; FARROKH-GISOOR, A.; SAMIEI, A. *et al.* Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. **Vaccine**, 24, n. 29-30, p. 5708-5717, Jul 2006.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **J Immunol Methods**, 422, p. 1-12, Jul 2015.

JE., L.; O, L.; M., N. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome* 2006.

JESPERSEN, M. C.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, 45, n. W1, p. W24-W29, Jul 3 2017.

JOSHI, S.; RAWAT, K.; YADAV, N. K.; KUMAR, V. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Advancements in Vaccine Development via Classical and Molecular Approaches. **Front Immunol**, 5, p. 380, 2014.

KAHL, L. P.; LELCHUK, R.; SCOTT, C. A.; BEESLEY, J. Characterization of Leishmania major antigen-liposomes that protect BALB/c mice against cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**, 58, n. 10, p. 3233-3241, Oct 1990.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Anal Biochem**, 34, n. 2, p. 595-598, Apr 1970.

KARP, C. L.; EL-SAFI, S. H.; WYNN, T. A.; SATTI, M. M. *et al.* In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **J Clin Invest**, 91, n. 4, p. 1644-1648, Apr 1993.

KAUR, T.; SOBTI, R. C.; KAUR, S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against Leishmania donovani in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, 33, n. 2, p. 95-103, Feb 2011.

KEDZIERSKA, K.; CURTIS, J. M.; VALKENBURG, S. A.; HATTON, L. A. *et al.* Induction of protective CD4<sup>+</sup> T cell-mediated immunity by a Leishmania peptide delivered in recombinant influenza viruses. **PLoS One**, 7, n. 3, p. e33161, 2012.

KENSIL, C. R. Saponins as vaccine adjuvants. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, 13, n. 1-2, p. 1-55, 1996.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**, 17, n. 3, p. 279-289, 1999 May-Jun 1999.

KIM, J. H.; LEE, C. S.; KIM, B. G. Spore-displayed streptavidin: a live diagnostic tool in biotechnology. **Biochem Biophys Res Commun**, 331, n. 1, p. 210-214, May 27 2005.

KUMAR, R.; GOTO, Y.; GIDWANI, K.; COWGILL, K. D. *et al.* Evaluation of ex vivo human immune response against candidate antigens for a visceral leishmaniasis vaccine. **Am J Trop Med Hyg**, 82, n. 5, p. 808-813, May 2010.

LAGE, D. P.; MARTINS, V. T.; DUARTE, M. C.; COSTA, L. E. *et al.* Cross-protective efficacy of Leishmania infantum LiHyD protein against tegumentary leishmaniasis caused by Leishmania major and Leishmania braziliensis species. **Acta Trop**, 158, p. 220-230, Jun 2016.

LAMOTTE, S.; SPATH, G. F.; RACHIDI, N.; PRINA, E. The enemy within: Targeting host-parasite interaction for antileishmanial drug discovery. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 11, n. 6, Jun 2017.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, 2, 2006.

LI, Q.; NING, D.; WU, C. [Surface display of GFP using CotX as a molecular vector on Bacillus subtilis spores]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, 26, n. 2, p. 264-269, Feb 2010.

LIMA, E. C. **Identificação e caracterização de novos antígenos para o diagnóstico da leishmaniose visceral**

**canina: estudo do gene Lc06.** Orientador: GRAMINHA, M. A. S. 2015a. 73 f. (Bacharel) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

LIMA, E. C. **Identificação e caracterização de novos antígenos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina: estudo do gene Lc06.** Orientador: GRAMINHA, M. A. S. 2015b. 73 f. (Bacharel) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J. *et al.* MURINE CUTANEOUS LEISHMANIASIS - SUSCEPTIBILITY CORRELATES WITH DIFFERENTIAL EXPANSION OF HELPER T-CELL SUBSETS. **Annales De L Institut Pasteur-Immunology**, 138, n. 5, p. 744-749, Sep-Oct 1987.

LOUIS, J.; HIMMELRICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COTTIER, F. *et al.* Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. **Curr Opin Immunol**, 10, n. 4, p. 459-464, Aug 1998.

LOUIS, J. A.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; HIMMELRICH, H.; TACCHINI-COTTIER, F. *et al.* Anti-leishmania effector functions of CD4<sup>+</sup> Th1 cells and early events instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. **Adv Exp Med Biol**, 452, p. 53-60, 1998.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C. *et al.* Chemical and enzymatic peptide syntheses: Basic aspects and applications. **Quimica Nova**, 27, n. 5, p. 781-789, Sep-Oct 2004.

MAROOF, A.; BROWN, N.; SMITH, B.; HODGKINSON, M. R. *et al.* Therapeutic vaccination with recombinant adenovirus reduces splenic parasite burden in experimental visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, 205, n. 5, p. 853-863, Mar 2012.

MARTINS, V. T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; COSTA, L. E.; CANAVACI, A. M. *et al.* Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, n. 3, p. e2148, 2013.

MARTINS, V. T.; DUARTE, M. C.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MENEZES-SOUZA, D. *et al.* A *Leishmania*-specific hypothetical protein expressed in both promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* employed for the serodiagnosis of, and as a vaccine candidate against, visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, 8, Jul 11 2015.

MARTINS, V. T.; LAGE, D. P.; DUARTE, M. C.; CARVALHO, A. M. *et al.* A recombinant fusion protein displaying murine and human MHC class I- and II-specific epitopes protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Cell Immunol**, 313, p. 32-42, 03 2017.

MATTIN, M. J.; SOLANO-GALLEGU, L.; DHOLLANDER, S.; AFONSO, A. *et al.* The frequency and distribution of canine leishmaniosis diagnosed by veterinary practitioners in Europe. **Vet J**, 200, n. 3, p. 410-419, Jun 2014.

MAURIELLO, E. M.; DUC, L. H.; ISTICATO, R.; CANGIANO, G. *et al.* Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine**, 22, n. 9-10, p. 1177-1187, Mar 12 2004.

MAZUMDAR, T.; ANAM, K.; ALI, N. A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of *Leishmania* vaccine instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. **Vaccine**, 22, n. 9-10, p. 1162-1171, Mar 2004.

MAZUMDER, S.; MAJI, M.; DAS, A.; ALI, N. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **PLoS One**, 6, n. 2, p. e14644, Feb 2011.

MCCALL, L. I.; MATLASHEWSKI, G. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. **Mol Microbiol**, 77, n. 2, p. 518-530, Jul 2010.

MCGAUGHEY, G. B.; CITRON, M.; DANZEISEN, R. C.; FREIDINGER, R. M. *et al.* HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb. **Biochemistry**, 42, n. 11, p. 3214-3223, Mar 25 2003.

MCKENNEY, P. T.; DRIKS, A.; ESKANDARIAN, H. A.; GRABOWSKI, P. *et al.* A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. **Curr Biol**, 20, n. 10, p. 934-938, May 25 2010.

MCNOLTY, A.; ANDERSON, H.; STRYKER, G. A.; DONDJI, B. Investigations on the effects of anti-*Leishmania* major serum on the progression of *Leishmania infantum* infection in vivo and in vitro - implications of heterologous exposure to *Leishmania* spp. **Parasitol Res**, 120, n. 5, p. 1771-1780, May 2021.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MILLER, E. M.; NICKOLOF, J. A. *Escherichia coli* Electrotransformation. In: J.A., N. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**: Humana Press, 1995. v. 47, cap. Electroporation Protocols for Microorganisms, p. 105-114.

MITTAL, N.; MUTHUSWAMI, R.; MADHUBALA, R. The mitochondrial SIR2 related protein 2 (SIR2RP2) impacts *Leishmania donovani* growth and infectivity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 11, n. 5, May 2017.

MONGUI, A.; PÉREZ-LLANOS, F. J.; YAMAMOTO, M. M.; LOZANO, M. *et al.* Development of a genetic tool for functional screening of anti-malarial bioactive extracts in metagenomic libraries. **Malar J**, 14, p. 233, Jun 04 2015.

MOXON, R.; RECHE, P. A.; RAPPUOLI, R. Editorial: Reverse Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, 10, n. 2776, 2019-December-03 2019. Editorial.

MUELLER, L. K.; BAUMRUCK, A. C.; ZHDANOVA, H.; TIETZE, A. A. Challenges and Perspectives in Chemical Synthesis of Highly Hydrophobic Peptides. **Front Bioeng Biotechnol**, 8, p. 162, 2020.

MURPHY, M. L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E. N.; HUNTER, C. A. *et al.* IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection. **Eur J Immunol**, 31, n. 10, p. 2848-2856, Oct 2001.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005 Oct 29-Nov 4 2005.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, 11, n. 10, p. 1464-1488, Oct 2011.

NASCIMENTO, I. P.; LEITE, L. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **Braz J Med Biol Res**, 45, n. 12, p. 1102-1111, Dec 2012.

NICO, D.; CLASER, C.; BORJA-CABRERA, G. P.; TRAVASSOS, L. R. *et al.* Adaptive immunity against Leishmania nucleoside hydrolase maps its c-terminal domain as the target of the CD4+ T cell-driven protective response. **PLoS Negl Trop Dis**, 4, n. 11, p. e866, Nov 09 2010.

NOGUEIRA, C. T. **Busca de antígenos para diagnóstico da leishmaniose visceral canina: potencial uso e aplicação da proteína rLc36**. Orientador: GRAMINHA, M. A. S. 2014. 104 f. (Doctor) - Biotechnology Graduate Program - Chemical Institute, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-São Paulo, Brazil.

NOGUEIRA, C. T.; DEL CISTIA, M. L.; URBACZEK, A. C.; JUSI, M. M. G. *et al.* Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 113, n. 3, p. 197-201, Mar 2018.

NYARI, S.; KHAN, S. A.; RAWLINSON, G.; WAUGH, C. A. *et al.* Vaccination of koalas (Phascolarctos cinereus) against Chlamydia pecorum using synthetic peptides derived from the major outer membrane protein. **Plos One**, 13, n. 6, Jun 28 2018.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, 2, n. 2, p. 135-146, May 2010.

NYLÉN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K. D. *et al.* Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **J Exp Med**, 204, n. 4, p. 805-817, Apr 2007.

ORGANIZATION, W. H. **Manual on environmental management for mosquito control, with special emphasis on malaria vectors**. Geneva, 1982. ISSN 9241700661. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37329>. Acesso em: August, 25th.

ORGANIZATION, W. H. Control of the leishmaniasis. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 949, p. xii-xiii, 1-186, back cover, 2010.

ORGANIZATION, W. H. **Leishmaniasis**. 2021a. Acesso em: August 23th.

ORGANIZATION, W. H. **Leishmaniasis**. 2021b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: August 23rd.

OSTYN, B.; GIDWANI, K.; KHANAL, B.; PICADO, A. *et al.* Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study. **PLoS Negl Trop Dis**, 5, n. 10, p. e1284, Oct 2011.

PARADÍS-BAS, M.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. The road to the synthesis of "difficult peptides". **Chem Soc Rev**, 45, n. 3, p. 631-654, Feb 2016.

PEDROLI, D. B.; RIBEIRO, N. V.; SQUIZATO, P. N.; DE JESUS, V. N. *et al.* Engineering Microbial Living Therapeutics: The Synthetic Biology Toolbox. **Trends Biotechnol**, 37, n. 1, p. 100-115, 01 2019.

PETERS, N. C.; BERTHOLET, S.; LAWYER, P. G.; CHARMOY, M. *et al.* Evaluation of recombinant *Leishmania* polyprotein plus glucopyranosyl lipid A stable emulsion vaccines against sand fly-transmitted *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **J Immunol**, 189, n. 10, p. 4832-4841, Nov 2012.

PONOMARENKO, J. V.; BOURNE, P. E. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. **Bmc Structural Biology**, 7, Oct 2 2007.

PURCELL, A. W.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. **Nat Rev Drug Discov**, 6, n. 5, p. 404-414, May 2007.

RAJPUT, Z. I.; HU, S. H.; XIAO, C. W.; ARIJO, A. G. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **J Zhejiang Univ Sci B**, 8, n. 3, p. 153-161, Mar 2007.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nat Med**, 19, n. 12, p. 1597-1608, Dec 2013.

REUTEN, R.; NIKODEMUS, D.; OLIVEIRA, M. B.; PATEL, T. R. *et al.* Maltose-Binding Protein (MBP), a Secretion-Enhancing Tag for Mammalian Protein Expression Systems. **Plos One**, 11, n. 3, Mar 30 2016.

RODRIGUEZ-PINTO, D. B cells as antigen presenting cells. **Cellular Immunology**, 238, n. 2, p. 67-75, Dec 2005.

RONET, C.; VOIGT, H.; HIMMELRICH, H.; DOUCEY, M. A. *et al.* *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice. **J Immunol**, 180, n. 7, p. 4825-4835, Apr 2008.

ROSALES-MENDOZA, S.; ANGULO, C. *Bacillus subtilis* comes of age as a vaccine production host and delivery vehicle. **Expert Review of Vaccines**, 14, n. 8, p. 1135-1148, Aug 2015.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, 65, n. 1, p. 40-48, Oct 2006.

SALJOUGHIAN, N.; TAHERI, T.; RAFATI, S. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, 5, Mar 2014.

SAÚDE, O. P.-A. D. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas**. Washington, D.C., 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Acesso em: August, 24th.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; SHER, A. B lymphocytes are required for the generation of T cells that mediate healing of cutaneous leishmaniasis. **J Immunol**, 137, n. 3, p. 1017-1021, Aug 01 1986.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, 47, n. 6, p. 412-423, Jun 2009.

SHETTY, R. P.; ENDY, D.; KNIGHT, T. F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. **J Biol Eng**, 2, p. 5, Apr 2008.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99, n. 3, p. 239-251, May 2004.

SINGH, S.; KUMARI, V.; SINGH, N. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. **Clin Diagn Lab Immunol**, 9, n. 3, p. 568-572, May 2002.

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

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, 236, n. 4804, p. 944-947, May 22 1987.

SOLANO-GALLEGO, L.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; PETERSEN, C. *et al.* Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. **Trends in Parasitology**, 33, n. 9, p. 706-717, Sep 2017.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors**, 4, p. 86, May 20 2011.

SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, 9, May 2016.

STAGER, S.; SMITH, D. F.; KAYE, P. M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, 165, n. 12, p. 7064-7071, Dec 2000.

STARK, B.; ANDREAE, F.; MOSGOELLER, W.; EDETSBERGER, M. *et al.* Liposomal vasoactive intestinal peptide for lung application: protection from proteolytic degradation. **Eur J Pharm Biopharm**, 70, n. 1, p. 153-164, Sep 2008.

STAUBER, L. A. Host Resistance to the Khartoum Strain of *Leishmania donovani*. **Rice Institute Pamphlet - Rice University Studies**, 45, 1958.

STERN, J. J.; OCA, M. J.; RUBIN, B. Y.; ANDERSON, S. L. *et al.* Role of L3T4<sup>+</sup> and LyT-2<sup>+</sup> cells in experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol**, 140, n. 11, p. 3971-3977, Jun 1988.

STEVENS, T. L.; BOSSIE, A.; SANDERS, V. M.; FERNANDEZ-BOTRAN, R. *et al.* Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, 334, n. 6179, p. 255-258, Jul 21 1988.

TIZARD, I. R. Adjuvants and Adjuvanticity. **Vaccines for Veterinarians**, 2020.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol**, 25, n. 11-12, p. 569-579, Nov-Dec 2003.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitol Int**, 54, n. 2, p. 139-146, Jun 2005.

VAKILI, B.; ESLAMI, M.; HATAM, G. R.; ZARE, B. *et al.* Immunoinformatics-aided design of a potential multi-epitope peptide vaccine against *Leishmania infantum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 120, p. 1127-1139, Dec 2018.

VAKILI, B.; NEZAFAT, N.; ZARE, B.; ERFANI, N. *et al.* A new multi-epitope peptide vaccine induces immune responses and protection against *Leishmania infantum* in BALB/c mice. **Medical Microbiology and Immunology**, 209, n. 1, p. 69-79, Feb 2020.

VELEZ, R.; GALLEGO, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. **Tropical Medicine & International Health**, 2020.

VIJAYAMAHANTESH; AMIT, A.; DIKHIT, M. R.; SINGH, A. K. *et al.* Immuno-informatics based approaches to identify CD8<sup>+</sup> T cell epitopes within the *Leishmania donovani* 3-ectonucleotidase in cured visceral leishmaniasis subjects. **Microbes Infect**, 19, n. 6, p. 358-369, 06 2017.

WANG, P. Natural and Synthetic Saponins as Vaccine Adjuvants. **Vaccines (Basel)**, 9, n. 3, Mar 05 2021.

WANG, Z. E.; REINER, S. L.; ZHENG, S.; DALTON, D. K. *et al.* CD4<sup>+</sup> effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. **J Exp Med**, 179, n. 4, p. 1367-1371, Apr 1 1994.

WESTERS, H.; DORENBOS, R.; VAN DIJL, J. M.; KABEL, J. *et al.* Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. **Mol Biol Evol**, 20, n. 12, p. 2076-2090, Dec 2003.

WOELBING, F.; KOSTKA, S. L.; MOELLE, K.; BELKAID, Y. *et al.* Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **J Exp Med**, 203, n. 1, p. 177-188, Jan 23 2006.

WU, T.; WU, X. L.; OU, S. H.; LIN, C. X. *et al.* Difference of T cell and B cell activation in two homologous proteins with similar antigenicity but great distinct immunogenicity. **Molecular Immunology**, 44, n. 12, p. 3261-3266, May 2007.

YANG, W. T.; YANG, G. L.; WANG, Q.; HUANG, H. B. *et al.* Protective efficacy of Fc targeting conserved influenza virus M2e antigen expressed by *Lactobacillus plantarum*. **Antiviral Research**, 138, p. 9-21, Feb 2017.

ZHANG, W. W.; KARMAKAR, S.; GANNAVARAM, S.; DEY, R. *et al.* A second generation leishmanization vaccine with a markerless attenuated *Leishmania major* strain using CRISPR gene editing. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 3461, 07 10 2020.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94, n. 16, p. 8807-8811, Aug 1997.

ZHANG, W. W.; MENDEZ, S.; GHOSH, A.; MYLER, P. *et al.* Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. **Journal of Biological Chemistry**, 278, n. 37, p. 35508-35515, Sep 2003.

## ANEXO

### Sequências nucleotídicas das ORFs utilizadas neste trabalho

ORF *lc36*:

>LINF\_360049000 | Leishmania infantum JPCM5 | hypothetical protein | genomic |  
 LinJ.36 forward | (geneStart+0 to geneEnd+0) | length=2220  
 ATGGGGCGAATCGACTCCTCTTGTGTGCTGCCACGGTGACGCCTAGCAAGGTCGGCGCA  
 TCGTCGTCTTGTCCCGGCACGGCGACAAGCACTGGCAAGATAGACGAGCCTGCTTCTCGC  
 GCCGCTGCCCCGCAGGGCCGGGCGCAGCGATGTGGCCGAGCGCGACCCGCCAGATGCAC  
 AACAGCCTCAGTGCAGGGGATGTGTGATAACCAACAGCAGCAGCAGCCGAGGCGTTTGGAAG  
 TTGATTGCGAGGGCCGAGAGCGCCTCCACGACTCCGCCCGCGCTCGTGATGGGTGACGGC  
 ACAGGCGGCGAGGATCATGCGCAGGTGCCCCACACCGGCGTCCGGTGGACTAAGCACGCG  
 TGGGAAAAGGGCAACGACTGCCCTGCGGGTAGCGCGTACGGGTCTTTTGTAGGCGCGCCG  
 CTGCGCAGGCTGCCGCCAACGCCTCCGTTCCCTGGTGTGCGTCTTCCCGCCTGGTGTGCG  
 TCCGCGTCCGCGACGGCGTATCCGCTCTCCGAGGATGGCCTCACAACGAGCTGCTGGAC  
 TTCTTCTATTATCTGCAGTTGACCTCCCATGAGGAAGCGGCACGGGAGCGGCTGCTTGGC  
 TACGTGCAGGCGTGCCTGGCGAAGTTGTGGGGCCCCTGTAAACCGGGGAGCGAAGCCGAG  
 GGAACAGCACAGGTGATGCTGTACGGCAGCTACGCTCTAGGGCTTTCTCTTCCAAGCAGC  
 GACATTGATCTTGCCCTGACTTTCCCGGCCGAGGAGCAGGTGGACGTCGCGACCATTTGCA  
 GTTGAGGAAAGGAGTGGGGATCGCGCTCTCCTGGCGCCGGCGGTCTCGAAGAAACGCCAG  
 GCGCTGCACCTTGAGCGGCTCCACGATCTTGCCGAGCAGCTGCGGAACCTCTGCGACGTTT  
 CCCGAGTTGGAGGTAGAGGTGTATGATCAGTGCCGTGTGCCGCGCATTTCATCTACGAGAC  
 AGGACTTGTGGTGGCGTGTGCTGTGACATCAACAGCTCCTTCGCCTCAGCACGCATCGCC  
 CGCATCGTGGCGCGGCAGCGGCTATGGCTACAGGACTCCCCGCTCGCGGCGTTCCTCGTG  
 CGCGTCACCAAGGCAGCCGTGAAGCAGTGGGGCCTCCACGAAGTGTCTGGGGCGGCGTC  
 GCCTCCACTGCGCTGTACTGCCTAGTGCTCCGCTTCCTCGCCCAGATGGAACAGCTTTGC  
 CGACACGCGCAGGTGGAGGAGAATTTGTCTCCACCGCGCTACGCGGAGGCCGCCGCCGCG  
 CATGTGCGCAACGCAGCTCTCTTCGTTGGCTTGTTCGTCACCGTTGTCTTCACCACAACCTC  
 TCCATGCCACACCCAGCCAACGAGTCTTTCGCAGCGTTTACCCAGTTCCAGCCGGCAGC  
 GCTTCCACTGCTCGCGGCCTCAACAGGCTAAGCGCGGCGGCAGCCGTTTCCTTCATATGTA  
 CCCAGCTGGGTTGTGAATAGCAGGAAGCACGACTTGAACAAGTCGTCGTCCTTGTGCGAT  
 ATGGACAAGAACAGCGCGCTGTGCCCTGTGAGTTTGACCGCTTGCTCCCTTTCCGATTGG  
 AGCAGATGAGCAGCACGTGCGACGAGGATAGGGAGGCGGACGACGAGGTGGATGGCTAC  
 ACGCAGGCGGGTCTCACGCGCACCTCCGGCGCCACCACCACTGCGACTACGCCGATCTCT  
 CGCACCGCGCGAGCACACCGATGCCGGCTGCAAGCGAAGCGCATGAGGGAGGCACAGCG  
 ACCGCATCGAGTGCCCTTGGCACCACCACTGAGCGTCAATTCTGCTGCGCTTCGCGAGGGC  
 GTGTTTCCAGTGCGGATGGACTTACTCAGATCGCGCGATCACGGTATGGCGCGTCGCCA  
 GCGCGTCTACTGCTGAAGCTGTGGAAGTTTCTTTCTGCCGACGCTTTTGCGAACGGGTAT  
 CAGGTAGCAGATGCCTTTGGAGATGACGCGGTGTGGTGCAGTGCGGCGAGGCGGGCGAC  
 TCGGCCGCGCTACCAAAGCAGCTTCCGCTCATGGCGTCGCTTGAAGTGGCCACGATTGCG  
 GGCATGAGCAGCGCCGACCTCTCCGCTGCATCTTTTCGGCTTCCTGAGCTACTGGCACTC  
 TTTCGCCACTCGAGCACGTCACTGGAGAGCATGCTCCGGTATCAGCGCTACCCGCGGGCGC  
 ACCGTGCCAACGATGCTCTCTACCATCTTTGTGACCCCTCGGCTGCCGACTAACTCTTGA

Link de acesso: [https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/LINF\\_360049000](https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/LINF_360049000)

ORF *lc06*:

>LINF\_220009200 | Leishmania infantum JPCM5 | hypothetical protein - conserved | genomic  
 | LinJ.22 reverse | (geneStart+0 to geneEnd+0) | length=7254  
 ATGGCGCAGGCCGTGTGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGC  
 CGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTTCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGGCGTTG  
 CTGCCGAGGCGGCGGGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCC  
 GTGTGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGA  
 GCAGGAGCGCGCTTTCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGGCGTTGCTGCCGAGGCGG



TCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCA  
GGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGTTGCTGCCGAGGCGCGCG  
GCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAG  
GGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTG  
CGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTGGCGC  
AGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGC  
GCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGA  
GGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGG  
ACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAG  
GCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCG  
GCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGG  
ACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCC  
GCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGCT  
TGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGG  
CCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCC  
GAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGC  
GGCGGGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCG  
CCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCAGGAGCGCGCGCGCG  
CCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTG  
GCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAC  
CGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTC  
GAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGA  
GGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTG  
AGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCT  
GCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGC  
GGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGG  
CCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCG  
GTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCA  
GGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCG  
CCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAG  
GCGGCGGGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAG  
CGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGC  
GCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCG  
CTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGG  
CAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTG  
CGTCGGAGGAGTGCCTGCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTGGCGCAGCTG  
GCGGAGGACCGCGCCGCGGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGC  
CCTTGAGGCAACCGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGT  
GCGCTGCGCGCGCCGCGCTTGCTGCCGAGGCGCGCGCGCGCTGGCGCAGCTGGCGGAGGACCGC  
GCCGCGACATGGCGCAGGCCGTGTCGAGCGCCGAGGGAGGCAGCCGCGCCGCCCTTGAGGCAAC  
CGAGGCCGCCGAGCGCGCCGAGCAGGAGCGCGCTTGCGTTGCGTCGGAGGAGTGTGTTGGGCGGT  
TATCGGCATCTGGGTGTGGTGTGTTGTAAGTGGGGTACTCTTGTTGGGGATGGAATGTGGCAGGCATG  
ACTGTTCTTTGCGTTTTTCGTATCCCTTGCTGCGTGTGTTCTACGTTTGTTGAGGAAGAGGAGGA  
TATGCGCGCGCTGTTACAGCGTGAGGAGATTGTTGCTCGAAGATGGAAGGTGTGCGCTTGTTTCGC  
TCCAGGGTCGCTAGCGTCGCGGGGTTTGAAGAAAGCGGAACGTCTCCGTATATCGCGAGGTTTC  
TGTGACGGAAGTCTTATCTCAGCATGGTGTGTTTGAAGGGACGCGCAACAGTGTGACCAGCGACGC  
GCTTCAGCGGTGGGTTCGTTTCAATCGCTGA

Link de Acesso: [https://tritypdb.org/tritypdb/app/record/gene/download/LINF\\_220009200](https://tritypdb.org/tritypdb/app/record/gene/download/LINF_220009200)

## Sequências de aminoácidos das ORFs:

LC36:

>LINF\_360049000 | Leishmania infantum JPCM5 | hypothetical protein | protein | length=739  
MGRIDSSCVAATVTPSKVGASSSCPGTATSTGKIDEPASRAAAPQGRAQRCGRARPAQMH  
NLSAGMCDNQQAAGVWKLIAGPQSASTTPPPLVMGDGTGGEDHAQAAHTGVRWTKH  
AWEKGNDCPAGSAYGSFVGAPLRRLPPTPPFPGVRLPAWCRSASATAYPLSEDGLTNELDDFF  
YYLQLTSHEEAARERLLGYVQACVAKLWGPKPGSEAEGTAQVMLYGSYALGLSLPSSDIDL  
ALTFPAEEQVDVATIAVEERSGDRALLAPAVSKKRQALHLERLHDLAEQLRNSATFPELEVEV  
YDQCRVPRIHLRDRTCGGVSCDINSSFASARIARIVARQRLWLQDSPLAAFLVRVTKAQVKQ  
WGLHEVFWGGVASTALYCLVLRFLAQMEQLCRHAQVEENLSPPRYAEAAAAHVATQLSSL  
ACSSPLSSPQLSMPHPANESFAAFTPVPAGTASTARGLNRLSAAAAPSYVPSWVNSRKHDL  
NKSSSLCDMDKNSALCPVSLTACSLSDWSTMSSTCDEDREADDEVDTGTYTQAGLTRTSGATTT  
ATTPISRTAASTPMPAASEAHEGGTATASSALAPPVSVNSAALREGVFPSADGLTQIARSRYG  
ASPARLLLKLWKFLSADAFANGYQVADAFGDDAVWCDCGEAGDSAALPKQLPLMASLELA  
TIAGMSSADLSAASFRLPELLALFRHSSTSLESMLRYQRYPRRTVPTMLSTIFVDPRLPTNS

LC06:

>LINF\_220009200 | Leishmania infantum JPCM5 | hypothetical protein - conserved | protein |  
length=2417  
MAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAA  
DMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRA  
ADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDR  
AADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAED  
RAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAE  
DRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLA  
EDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQL  
AEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQ  
LAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALA  
QLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAGAL  
LAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEAAG  
ALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEA  
GALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAEA  
AGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAAE  
AAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGVAA  
EAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAGV  
AAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAARAG  
VAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAAR  
GVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECAAR  
AGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECA  
RAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEECA  
ARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEEC  
AARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASEE  
CAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVASE  
ECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVAS  
EECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAEQERACVA

SEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERACV  
 ASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERAC  
 VASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERAC  
 CVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERAC  
 ACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERAC  
 RACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERAC  
 ERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERAC  
 QERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERAC  
 EQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERAC  
 AEQERACVASEECAARAGVAAEAAGALAQLAEDRAADMAQAVSSAEGGSRAALEATEAAERAERAEQERAC  
 RAEQERACVASEGCVGRSLASGCGVCSGGTLVGMECGRHDCSLRFSYPLSACVLRLVEEE  
 EDMRALLQREEIVARRWKVSRFCAPGSLASRGLEGKRNVS VYREVSVTDCLS QHGVFEGT  
 RNSVTSDALQRWVRSNR

### Plasmídeos Recombinantes obtidos neste trabalho

Figura 41 — Mapa do plasmídeo pBS0EXyIRPxylA\_V2-LC36HisTag após clonagem. Em destaque no mapa estão os sítios do BioBrick prefixo e sufixo com os respectivos sítios de restrição enzimático. Também, observa-se a região do sítio de trombina e a cauda de histidina, assim como a ORF *lc36*, os oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento (402 e 403) e o sítio de *PstI* no interior da ORF.

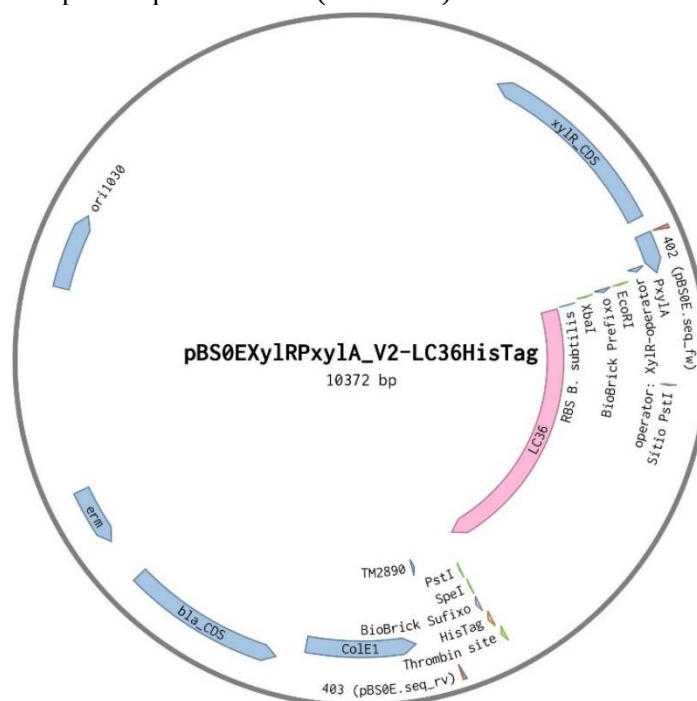


Figura 42 — Mapa do plasmídeo pGEM- T Easy-Thrombin-LC36. Em destaque no mapa estão os sítios restrição das enzimas *NcoI* e *EcoRV*. Também, observa-se a região do sítio de trombina, assim como a ORF *lc36*.

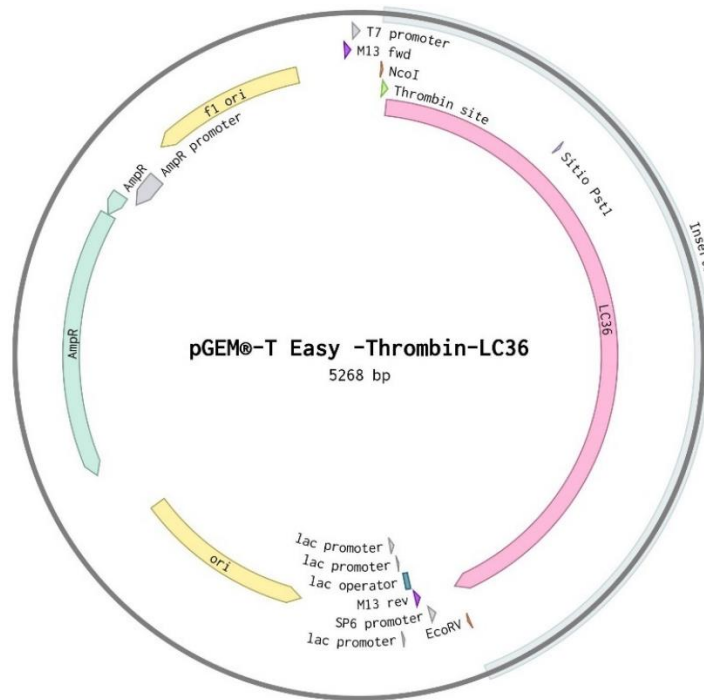


Figura 43 — Mapa do plasmídeo pMAL-p5x-LC36 após clonagem. Em destaque no mapa estão os sítios restrição das enzimas *NcoI* e *EcoRV*. Também, observa-se a região do sítio de trombina, assim como a ORF *lc36*, o gene da MBP e os oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento (Pfw. 472 e Prv. 473).

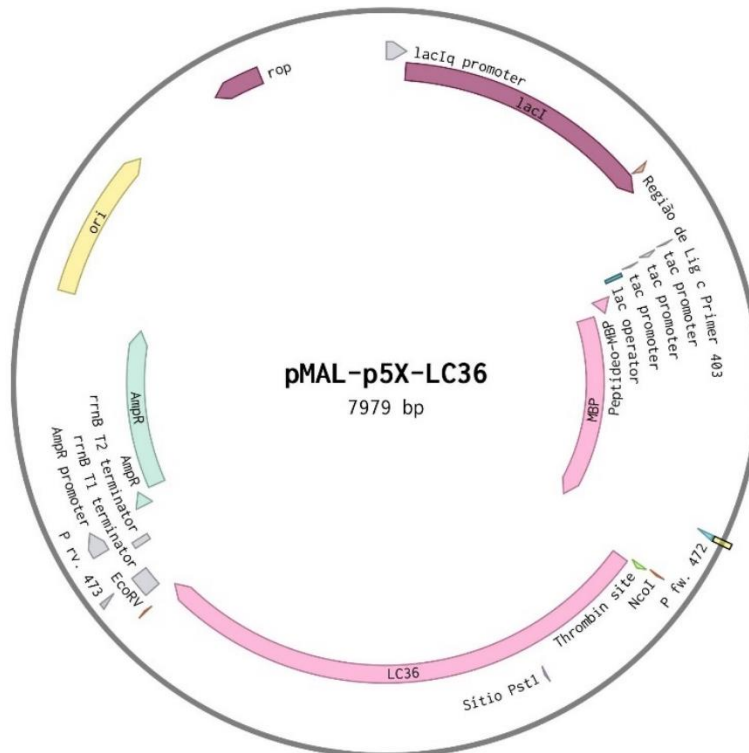


Figura 44 — Mapa do plasmídeo pBS0EXyIRPxylA\_V2-MBP-Thrombin-LC36 após clonagem. Em destaque no mapa estão os sítios do BioBrick prefixo e sufixo com os respectivos sítios de restrição enzimático. Também, observa-se a região do sítio de trombina, assim como a ORF *lc36* e MBP, os oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento (402 e 403) e o sítio de *Pst*I no interior da ORF.

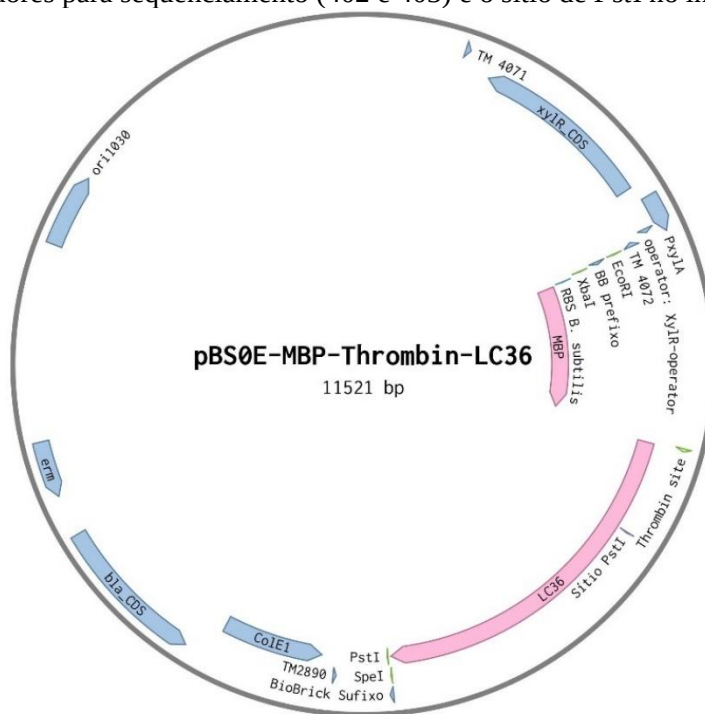


Figura 45 — Mapa do plasmídeo pBS0EXyIRPxylA\_V2-PeptídeoLC06 após clonagem. Em destaque no mapa estão os sítios do BioBrick prefixo e sufixo com os respectivos sítios de restrição enzimático. Também, observa-se a região do sítio de trombina, assim como a sequência nucleotídica para o peptídeo LC06, os oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento (402 e 403).

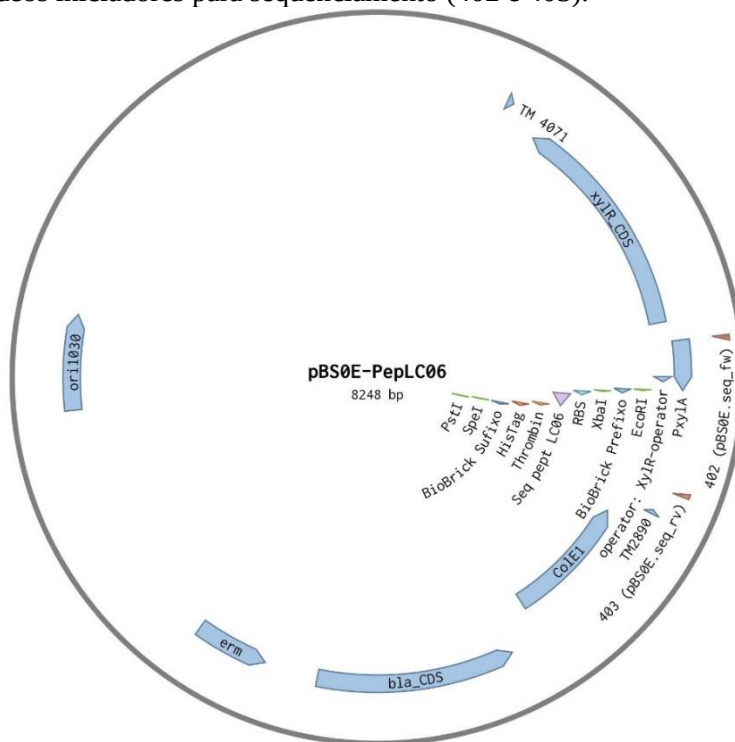




Tabela 5 — Epítomos ligantes putativos para MHC-I, de acordo com os servidores Rankpep, IEDB e NetMHCpan. Para cada peptídeo é mostrado a pontuação/classificação de acordo com cada método. Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

| Epítopo<br>Alelo | Rankpep <sup>a</sup> |           |           |           |        | IEDB <sup>b</sup> |           |           |           |        | NetMHCpan <sup>c</sup> |           |           |           |           |
|------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|--------|-------------------|-----------|-----------|-----------|--------|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                  | H-<br>2Kb            | H-<br>2Kd | H-<br>2Db | H-<br>2Dd | H-2Ld  | H-<br>2Kb         | H-<br>2Kd | H-<br>2Db | H-<br>2Dd | H-2Ld  | H-<br>2Kb              | H-<br>2Kd | H-<br>2Db | H-<br>2Dd | H-<br>2Ld |
| KQLPLMASL        | 11,67                | -         | 7,195     | -         | -      | 0,476             | 0,273     | 0,333     | 0,119     | 0,097  | SB                     | SB        | SB        | WB        | WB        |
| AAAHVATQL        | 9,253                | -         | 5,788     | 15,039    | -      | 0,300             | 0,104     | 0,247     | 0,1       | 0,146  | WB                     | WB        | WB        | WB        | WB        |
| TVPTMLSTI        | -                    | -         | -         | -         | -      | 0,441             | 0,207     | 0,417     | 0,3072    | -      | WB                     | WB        | SB        | SB        | -         |
| ASFRLPELL        | 6,957                | 6,334     | -         | -         | -      | 0,557             | -         | 0,488     | 0,256     | -      | SB                     | WB        | -         | SB        | WB        |
| AASFRLPEL        | 10,746               | -         | -         | -         | 12,156 | 0,385             | -         | -         | 0,169     | -      | WB                     | WB        | SB        | WB        | WB        |
| RLPELLALF        | -                    | -         | 4,185     | -         | -      | 0,351             | 0,108     | -         | 0,387     | -      | WB                     | WB        | -         | SB        | WB        |
| YGASPARLL        | 7,432                | 9,134     | -         | -         | -      | -                 | -         | -         | 0,325     | 0,124  | -                      | WB        | -         | SB        | WB        |
| VMLYGSYAL        | 4,373                | -         | 6,403     | -         | -      | 0,346             | -         | 0,285     | -         | -      | WB                     | WB        | WB        | -         | -         |
| AALPKQLPL        | 3,925                | -         | 5,788     | -         | -      | 0,478             | -         | 0,612     | 0,164     | 0,1630 | SB                     | WB        | SB        | WB        | WB        |

<sup>a</sup> Critério de classificação: maior o valor da pontuação melhor a ligação, <sup>b</sup> Critério de classificação: menor o valor da pontuação melhor a ligação,

<sup>c</sup> Classificação quanto à força da ligação com MHC: SB – ligantes fortes; WC – ligantes fracos e (-) ausência de ligantes.

Tabela 6 — Epítomos ligantes putativos de MHC-II segundo os três servidores Rankpep, IEDB e NetMHCpIIan. Para cada peptídeo é mostrado a pontuação/classificação para cada método.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

| Epítomos<br>Alelos | Rankpep <sup>a</sup> |     |     | IEDB <sup>b</sup> |      |     | NetMHCIIpan <sup>c</sup> |     |     |
|--------------------|----------------------|-----|-----|-------------------|------|-----|--------------------------|-----|-----|
|                    | IAb                  | IAd | IEd | IAb               | IAd  | IEd | IAb                      | IAd | IEd |
| YAEAAAAHV          | 20,71                | -   | -   | -                 | -    | -   | SB                       | SB  | -   |
| ARIARIVAR          | 15,96                | -   | -   | -                 | -    | -   | -                        | SB  | WB  |
| PRYAEAAAA          | 12,73                | -   | -   | -                 | -    | -   | SB                       | WB  | -   |
| LSPPRYAEAAAAHV     | -                    | -   | -   | 0,34              | 2,13 | -   | -                        | -   | -   |
| PISRTAASTPMPAAS    | -                    | -   | -   | 0,4               | 2,55 | -   | -                        | -   | -   |
| ISRTAASTPMPAASE    | -                    | -   | -   | 0,47              | 3,57 | -   | -                        | -   | -   |
| NLSPPRYAEAAAAHV    | -                    | -   | -   | 0,5               | -    | -   | -                        | -   | -   |
| SRTAASTPMPAASEA    | -                    | -   | -   | 0,51              | 3,46 | -   | -                        | -   | -   |
| PPRYAEAAAAHVATQ    | -                    | -   | -   | 0,67              | 1,75 | -   | -                        | -   | -   |
| PRYAEAAAAHVATQL    | -                    | -   | -   | 0,71              | 2,00 | -   | -                        | -   | -   |
| SPPRYAEAAAAHVAT    | -                    | -   | -   | 0,37              | 1,73 | -   | -                        | -   | -   |
| RYAEAAAAHVATQLS    | -                    | -   | -   | -                 | 2,35 | -   | -                        | -   | -   |
| TTPISRTAASTPMPA    | -                    | -   | -   | 0,76              | 3,55 | -   | -                        | -   | -   |
| ARIARIVARQRLWLQ    | -                    | -   | -   | -                 | -    | 3,4 | -                        | -   | -   |
| PSYVPSWVVNSRKHD    | -                    | -   | -   | -                 | -    | 2,1 | -                        | -   | -   |
| VPSYVPSWVVNSRKH    | -                    | -   | -   | -                 | -    | 3,3 | -                        | -   | -   |
| SFASARIARIVARQR    | -                    | -   | -   | -                 | 1,6  | -   | -                        | -   | -   |
| FASARIARIVARQRL    | -                    | -   | -   | -                 | 2    | -   | -                        | -   | -   |
| NSSFASARIARIVAR    | -                    | -   | -   | -                 | 2,15 | -   | -                        | -   | -   |

<sup>a</sup> Critério de classificação: maior o valor da pontuação melhor a ligação, <sup>b</sup> Critério de classificação: menor o valor da pontuação melhor a ligação, <sup>c</sup> Classificação quanto à força da ligação com MHC: SB – ligantes fortes; WC – ligantes fracos e (-) ausência.

## APENDICIE A — Aprovação do comitê de Ética



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da imunogenicidade de peptídeos derivados de proteínas de *Leishmania infantum* em camundongos BALB/c”, registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr. 19/2020, sob a responsabilidade do Wilquer Castro Laurindo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 26 de outubro de 2020.

Considerações: A CEUA sugere que o pesquisador analise a viabilidade e os benefícios de realização de análises em outros órgãos dos animais, além da análise no sangue.

|                         |                                    |
|-------------------------|------------------------------------|
| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | Setembro de 2021                   |
| Espécie/linhagem/raça   | Camundongo isogênico Balb/C        |
| Nº de animais           | 88                                 |
| Peso/Idade              | 20-30 g / 5-8 semanas              |
| Sexo                    | Machos                             |
| Origem                  | 2- CEMIB - UNICAMP                 |
| Registro CIAEP          | 02.00082.2019                      |

Araraquara, 12 de novembro de 2020.

Prof Dr Marcelo Tadeu Marin  
Coordenador da CEUA