

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

GABRIEL DUARTE DOS SANTOS

Biologia Sintética aplicada no Desenvolvimento de uma vacina recombinante para o controle da
leishmaniose visceral canina

Araraquara

2022

GABRIEL DUARTE DOS SANTOS

Biologia Sintética aplicada no Desenvolvimento de uma vacina recombinante para o controle da
leishmaniose visceral canina

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia A. S.
Graminha

Coorientador: Prof Dr Deivys Portuondo

Araraquara

2022

S237b	Santos, Gabriel Duarte dos Biologia sintética aplicada no desenvolvimento de uma vacina recombinante para o controle da leishmaniose visceralcanina / Gabriel Duarte dos Santos. -- Araraquara, 2022 97 f. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista(Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientadora: Márcia Aparecida Silva Graminha Coorientador: Deivys Leandro Portuondo Fuentes 1. Doenças parasitárias. 2. Aminoácidos. 3. Peptídeos. 4. Vacinação. 5. Imunização. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"Biologia Sintética aplicada no Desenvolvimento de
uma vacina recombinante para o controle da
leishmaniose visceral canina"

AUTOR: GABRIEL DUARTE DOS SANTOS**ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA****COORDENADOR: DEIVYS LEANDRO PORTUONDO FUENTES**

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



Dra. ANGELA MARIA ARENAS VELASQUEZ (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JOAO ARISTEU DA ROSA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 21 de setembro de 2022

DADOS CURRICULARES

Nome: Gabriel Duarte dos Santos

Filiação: Wanderléa Duarte dos Santos e Sérgio dos Santos

Nascimento: 05/02/1997 – Santos - SP

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: duarte.santos@unesp.br

Formação Acadêmica:

2016 - 2020

Graduação: Bacharel em Química Tecnológica.

Instituição: Universidade Católica de Santos – Campus Dom Idílio – Santos, SP.

2020 - 2022

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: Biologia Sintética aplicada no Desenvolvimento de uma vacina recombinante para o controle da leishmaniose visceral canina

Orientadora: Profª Drª Márcia Graminha.

Coorientadora: Prof Dr Deivys Portuondo

Bolsa: CAPES

Participação em reuniões científicas e cursos de curta duração:

Realizou o curso “Ferramentas de Bioinformática para Análise de Proteínas e Peptídeos”, ministrado pela Msc. Rayane Monique Bernardes Loch e pela doutoranda Geniana da Silva Gomes, da Universidade Federal de Viçosa, parceiras do projeto Escola do Vira Lata, com carga horária de 7 horas. (14/12/2021)

Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão: Capacitação no Uso e Manejo de

Animais de Laboratório. Realizado pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com carga horária de 60 horas. (26/11/2021)

Realizou o curso de “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): princípios e aplicações” ministrada pela Profª Drª Andreanne Gomes Vasconcelos - Biomédica, Doutora em Ciências Médicas, CEO da People&Science, Professora no UDF Centro Universitário e Pesquisadora no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA-FM-UnB) – realizado pela People&Science e pelo Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, na forma de treinamento técnico online com carga horária de 4 horas. (25/03/2022)

Realizou curso de “Tóxicologia”, ministrado pela Profª Drª Kaline Sousa. O curso foi realizado pelo Centro Educacional Sete de Setembro, tendo como conteúdo programático a Introdução à Tóxicologia, Toxicocinética, Toxicodinâmica e Avaliações de Toxicidade, com carga horária de 40 horas. (29/07/2022)

Realizou curso de “Bionanotecnologia” promovido pela equipe da Biotecnologia Brasil. Ministrado pelos mestrandos Gabriellen Kelly Amaral de Oliveira (Engenheira de Bioprocessos - UFPA) e Jonas Cunha da Silva (Engenheiro de Bioprocessos – UFPA). Curso com uma carga horária total de 15 horas. (26/07/2022)

Realizou curso de “Introdução à Biologia Molecular” promovido pela equipe da Biotecnologia Brasil. Ministrado pela doutoranda em Genética e Bioquímica (UFU) Bruna Mundim, também pela mestranda em Ciências Genômicas e Biotecnologia (UnB) Giovanna Esperidião, e o PhD em Biologia Molecular (UnB) Otávio Bravim da Silva. Curso com uma carga horária total de 15 horas. (26/07/2022)

Realizou curso de “Produção de Fármacos” promovido pela equipe da Biotecnologia Brasil. Ministrado pela Profª Drª Melissa Markoski. Curso com uma carga horária total de 15 horas. (26/07/2022)

Realizou curso de “Produção de Proteínas Recombinantes” promovido pela equipe da Biotecnologia Brasil. Ministrado pela doutoranda em Biotecnologia (UNESP) Beatriz Cristina Pecoraro Sanches, também pela doutoranda em Biotecnologia (UNESP) Michele Fernanda Dutra, e Profª Drª Priscila Alves Silva. Curso com uma carga horária total de 15 horas. (26/07/2022)

Realizou curso de “PCR em Tempo Real no diagnóstico molecular de doenças” promovido pela equipe da Biotecnologia Brasil. Ministrado pela Profª Drª Juliana S M Pimentel, da Faculdade de Ciências da Vida de Sete Lagoas. Curso com uma carga horária de 10 horas (26/07/2022)

Realizou “Curso Online Nacional de Análises Forenses de Drogas de Abuso”, ministrado pela Farmacêutica e Perita, Thayane Soares Lima, em formato virtual, contabilizando carga horária de 08 horas. (11/08/2022)

Realizou Curso Online Nacional de Papiloscopia Forense, ministrado pelo Químico e Especialista em Perícia Forense, Francisco José Matheus de Oliveira Diógenes, contabilizando carga horária total de 08 horas. (11/08/2022)

Realizou mini-curso “Introdução à Imunologia”, ministrado pelo Prof. Dr. Ivan B Feitosa, contabilizando carga horária total de 04 horas. (04/08/2022)

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, pois com ela aprendi a ser forte e correr atrás de todos os meus sonhos e objetivos sem precisar passar por cima de nada e nem ninguém, além de todo o amor que você me proporciona. E ao meu cachorrinho Abel, por ser o serzinho de luz que nos traz tanta felicidade nos dias mais difíceis como também nos bons!

Dedico-lhes essa dissertação como forma de demonstrar todo o meu amor e carinho por meio de um processo tão lindo de aprendizado que terei orgulho, daqui pra frente, de mostrar.

*“Não tenha pena dos mortos, tenha pena dos vivos. E acima de tudo, daqueles que vivem
sem amor.”*

Alvo Dumbledore

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus e a minha família, em especial a minha mãe por todo o nosso amor, por toda nossa parceria, por enfrentarmos e vencermos tudo o que passamos nesses últimos anos. Obrigado por tanto..!

Queria agradecer a mim mesmo, pois me superei desde o momento em que passei na prova do mestrado. A transformação pessoal e profissional que consegui ao longo desses dois anos, que me fizeram sair de um momento extremamente difícil da minha vida e estar aqui hoje com um belo trabalho concluído.

Agradeço imensamente a Professora Dr^a. Márcia Graminha, primeiramente por ter me aceitado como seu aluno (em um momento de caos onde não tinha orientador), acreditando em meu potencial mesmo com todas as complicações proporcionadas pela COVID-19 onde limitou e muito nosso tempo de experimentos em bancada durante um bom período do mestrado. Por toda a paciência em ensinar, acolher, ser rigorosa em momentos necessários e por me ajudar a ter uma visão mais abrangente profissionalmente falando. Com certeza será alguém que um dia citarei de maneira “minha orientadora de mestrado sempre dizia...”. Aprendi tanto! Muito obrigado professora!

Agradeço imensamente também ao Professor Dr. Deivys Leandro Portuondo Fuentes, primeiramente por ter aceitado ser meu coorientador, e também por todo o ensinamento referente a imunologia que você me proporcionou, logo eu que não tinha ideia de quais eram as moléculas responsáveis pela resposta imune. Por todo o estímulo de que tudo iria dar certo e que o meu trabalho iria ser defendido com a honra de ter sido um belo projeto. Muito obrigado, Deivys, de coração!

Agradeço ao Professor Dr. Eduardo Maffud Cilli por gentilmente permitir que eu realizasse a síntese do peptídeo, apresentado neste estudo, em seu laboratório. E, também, aos alunos do professor e ao Laboratório de Síntese e Estudos de Biomoléculas.

Agradeço à Dr^a. Marcela Tavares, por gentilmente ceder uma parte do seu tempo para formular os lipossomas onde os peptídeos seriam encapsulados, além de todos os estudos de caracterização dessas moléculas feitas de tão bom grado pela mesma.

Agradeço à Mariana Marchi Santoni, Técnica do Laboratório de Análises Biomoleculares – Multiusuários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, pelos sequenciamentos realizados e pela disponibilidade e paciência de explicar os resultados.

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;

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF-UNESP: à Michele por tudo! Como crescemos juntos nesse tempo, como nossa amizade cresceu de maneira orgânica e boa de uma maneira que hoje chego a ficar triste por voltar para a minha cidade e não ter mais nossas fofocas diárias e trocas de memes enquanto trabalhamos. Vou te levar no meu coração sempre! Ao Wilquer por ter me ajudado no início dessa loucura que é a pesquisa! Mas não só por ter me ajudado, por tudo, que grande amigo você é, é ótimo ter a sua companhia no dia a dia e fez muita falta quando teve que voltar para a sua cidade.. Obrigado, Wilquer, todos sabemos o quanto você é importante! À Maricely, éegua! Por toda a sua alegria que contagia, por todas as nossas conversas e os nossos apoios um com o outro! Nunca nos deixaremos sozinhos, sempre enfrentando o que tiver para enfrentar juntos! A moça de Belém do Pará mais belenense que eu conheço. Ao Leandro, por mais que não tenhamos seguido muito para as mesmas vertentes de trabalho, aprendi muito com você! Além de ser uma pessoa maravilhosa e disposta a ensinar tudo o que sabe de uma maneira maestral, é um amigo muito leal e que a gente sabe que pode contar e também dar boas risadas! Você é tudo Lê! À Juliana, nossa Jú! Por todos os momentos de surtos que você me acalmou, todas as risadas, todas as palavras de incentivo e ajuda que você me proporcionou no tempo em que tive a oportunidade de dividir bancada com você. Adoro você!! A Eduarda, que trabalhou como uma mestranda em sua iniciação científica e me ajudou a entender um pouco melhor a “biomol”, fora todos os nossos momentos juntos que foram incríveis! À Natália, por me ajudar a entender a síntese de peptídeos, por ajudar e colaborar com o meu trabalho, além de todos os ensinamentos que você me proporcionou ao longo desses dois anos. À Angela, pelo seu imenso conhecimento compartilhado, sempre disposta. E a Helena, a minha “ajudante” de iniciação científica que tive a oportunidade de ajudar, ensinar e conhecer nesse finalzinho de mestrado. Você é uma pessoa incrível e vai longe, obrigado por me ajudar nessa reta final!

Aos meus melhores amigos: Ana Paula, Beatriz (Bia), Elizabeth (Liza), Fernanda (Fefa), Matheus (Iron), Nicole e a Stefanie (Ste) por tudo, tudo, tudo! Como vocês foram e são importantes na minha vida! Quero que saiba que se estou aqui hoje, de cabeça erguida, em meio a surtos, sim, mas BEM, foi com uma grande parcela por causa de vocês! Eu amo vocês imensamente e sei que vocês estarão para sempre na minha vida e no meu coração! Nunca se esqueçam que vocês são maravilhosos e importantes para mim! Menção honrosa ao “Cyberzetes” que entre brigas e risadas a gente vai fazendo com que nosso amor cresça!

Obrigado!

Agradeço às minhas queridas amigas que fiz em Araraquara, da república “Skolcinhas”, principalmente à Maite, Ingrid, Maria Clara e Rebeca que fizeram com que esse meu período nesta cidade fosse repleto de alegria, risadas, e muito amor! Vocês não têm ideia do quanto foram importantes para mim e o quanto me ajudaram! Muito obrigado meninas, vocês estarão para sempre no meu coração!

Agradeço aos funcionários da FCFAr-UNESP Araraquara.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho: Processo n^{os} 2016/ 06931-4, 2017/03552-5, 2016/06931-4, 2020/04415-4 e INCT 2014/50926-0.

RESUMO

A *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) é o agente etiológico da leishmaniose visceral, presente nas Américas, tendo os cães como seu principal reservatório do parasita, seguido de posterior ocorrência de casos humanos. Para controle da doença, novas soluções preventivas em cães, como a produção de novas vacinas, faz-se necessário. Um fragmento protéico de 206 aminoácidos de *L. infantum* denominada Lc24, que já teve sua antigenicidade anteriormente avaliada pelo nosso grupo de pesquisa, é alvo do presente estudo. Primeiramente foi feita a clonagem do fragmento correspondente a 624 pb no vetor pMAL-p5X para a obtenção de um produto protéico fusionado à proteína *Maltose Binding Protein* (MBP), seguido de confirmação por sequenciamento. Devido ao insucesso da expressão da proteína recombinante, utilizou-se como estratégia alternativa a síntese de peptídeos. Para isso, utilizou-se uma estratégia de imuno-informática para seleção de epítomos contidos em sequências peptídicas pequenas, passíveis de serem sintetizadas, mas que guardassem as propriedades imunológicas de Lc24. A sequência protéica completa foi analisada utilizando os servidores BepiPred 2.0 e o ABCpred para reconhecimento de regiões de epítomos referentes a células B e, posteriormente, os servidores EpiDOCK, Rankpep, IEDB e NetMHCpan, para a predição de epítomos para os alelos H-2Kb, H-2Kd, H-2Db, H-2Dd e H-2Ld (para MHC-I) e IA-b, I-Ad e IE-d (para MHC-II), para reconhecimento por células efectoras do tipo T (CD4⁺ e CD8⁺). Os peptídeos selecionados também foram analisados *in silico* quanto a propriedades de antigenicidade, alergenicidade, toxicidade e similaridade frente a sequências de proteínas caninas e humanas. Dentre os diferentes peptídeos identificados, selecionou-se o peptídeo GD2102, tendo como base a metodologia de classificação de melhor peptídeo estudado neste trabalho para a síntese química. Importante destacar que foi adicionado uma valina na porção N-terminal para ajudar na estabilidade e solubilidade do peptídeo, e a sequência peptídica RS09, um conhecido adjuvante sintético. Adicionalmente, parte dos peptídeos também foram encapsulados em lipossomas para promover um processo mais lento de liberação. Embora não tenha sido detectado anticorpos IgG, IgG2 e IgG2a antígeno específicos em camundongos BALB/c e swiss imunizados com os peptídeos livres ou encapsulados (dias 0, 14 e 21 para a linhagem BALB/c e dias 0 e 14 para a linhagem swiss), novas análises são necessárias como a adição de uma aplicação de uma terceira imunização e/ou aumento na quantidade de peptídeos livres e encapsulados.

Palavras Chave: leishmaniose visceral; peptídeos sintéticos; epítomos; vacina peptídica.

ABSTRACT

Leishmania infantum (syn. *Leishmania chagasi*) is the etiologic agent of visceral leishmaniasis, present in the Americas, which has dogs as the main reservoir of the parasite, followed by the subsequent occurrence of human cases. To control the disease, new preventive solutions in dogs, such as the production of new vaccines, are necessary. A protein fragment of 206 amino acids from *L. infantum* called Lc24, which already had its antigenicity previously evaluated by our research group, is the subject of the present study. First, the fragment corresponding to 624 bp was cloned in the pMAL-p5X vector to obtain a protein product fused to the Maltose Binding Protein (MBP), followed by confirmation by sequencing. Given the failure of the recombinant protein expression, peptide synthesis was used as an alternative strategy. For this purpose, an immunoinformatics strategy was used to select epitopes contained in small peptide sequences that were capable of being synthesized but that retain the immunological properties of Lc24. The complete protein sequence was analyzed using the servers BepiPred 2.0 and ABCpred for the recognition of epitope regions referring to B cells. Later, the servers EpiDOCK, Rankpep, IEDB, and NetMHCpan, for the prediction of epitopes for the H-2Kb alleles, H-2Kd, H-2Db, H-2Dd, and H-2Ld (for MHC-I) and IA-b, I-Ad and IE-d (for MHC-II), for recognition by T-type effector cells (CD4⁺ and CD8⁺). The selected peptides were also analyzed in silico for properties of antigenicity, allergenicity, toxicity, and similarity to canine and human protein sequences. Among the different peptides identified, the peptide GD2102 was selected based on the best peptide classification methodology studied in this work for chemical synthesis. It is important to highlight that a valine was added in the N-terminal portion to help with the stability and solubility of the peptide, and the peptide sequence RS09, a known synthetic adjuvant. Additionally, part of the peptides was also encapsulated in liposomes to promote a slower release process. Although antigen-specific IgG, IgG2, and IgG2a antibodies were not detected in BALB/c and swiss mice immunized with the free or encapsulated peptides (days 0, 14, and 21 for the BALB/c strain and days 0 and 14 for the swiss strain), new analyzes are necessary such as the addition of a third immunization and/or increase in the amount of free and encapsulated peptides.

Keywords: visceral leishmaniasis; synthetic peptides; epitopes; peptide vaccine.

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Leishmanioses	15
1.2 A resposta imune nas leishmanioses	16
1.3 Vacinas e tratamentos contra a leishmaniose	18
1.3.1 O controle da LVC: as vacinas	19
1.4 Estudos de potencialização de ativação de resposta imune ao promover implementações da formulação vacinal e na estrutura de peptídeos	19
1.5 Lc24 e produção de vacina de peptídeos	21
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Linhagens de <i>L. infantum</i>	24
3.3 Linhagens de bactérias	24
3.4 Meios de cultura	25
3.5 Sequências	25
3.6 Extração de DNA genômico (gDNA)	25
3.7 Amplificação por PCR	26
3.8 Eletroforese em gel de agarose, manipulação e purificação de DNA	26
3.9 Transformação bacteriana	27
3.10 Extração de DNA plasmidial (pDNA)	27
3.11 Sequenciamento	27
3.12 Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	28
3.13 Extração de proteína	28
3.14 Western Blot	28
3.15 Predição de epítomos	29
3.15.1 Predição de epítomos de célula T CD4⁺	29
3.15.2 Predição de epítomos de célula T CD8⁺	30
3.15.3 Predição de imunogenicidade, toxicidade e alergenicidade	30
3.15.4 Predição de similaridade com proteoma de cães	30
3.15.5 Caracterização das propriedades físico-químicas dos peptídeos em estudo	31
3.15.6 Seleção e desenho imunógeno peptídico	31
3.16 Síntese de peptídeos	31
3.17 Reação de clivagem dos peptídeos	32

3.18 Purificação e caracterização dos peptídeos	33
3.19 Preparação da formulação vacinal Gel01/GD2202	33
3.20 Formulação vacinais	33
3.21 Encapsulamento de peptídeos de Lipossomas	34
3.22 Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i>	34
3.23 Ensaio de imunização	35
3.24 Obtenção do soro de camundongos	35
3.25 Resposta humoral	35
3.26 Análise estatística	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Obtenção da proteína Lc24 para estudos de imunogenicidade	37
4.2 Clonagem do gene Lc24 de <i>L. infantum</i> em vetor pMAL_p5X	37
4.3 Amplificação da sequência codificadora de Lc24	38
4.4 Ligação do inserto Lc24 no vetor de expressão pMAL_p5X	38
4.5 Indução da expressão da proteína Lc24 em <i>E. Coli.</i>	42
4.6 Predição de epítomos	44
4.7 Desenho e síntese do imunógeno peptídico	56
4.8 Síntese em fase sólida dos peptídeos GD2102 e GD2202	57
4.9 Imunização de camundongos Swiss com peptídeo GD2202	60
4.10 Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i>	61
4.11 Resposta humoral	62
5 CONCLUSÃO	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas, cuja prevalência afeta de maneira desproporcional as populações marginalizadas, em condições sanitárias deficientes e que tem acesso limitado a cuidados a saúde, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (DAWIT et al., 2013; OMS, 2022). Essa parasitose é uma doença infecto-parasitária que acomete o homem, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Esta doença pode se manifestar em diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro (GONTIJO e CARVALHO, 2003). Estima-se que a leishmaniose apresente uma prevalência de 12 milhões de casos no mundo, com 350 milhões de pessoas ameaçadas de contrair a doença em 88 países, 72 dos quais localizados em países em desenvolvimento. A saber, 90% dos casos ocorrem no Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão (ROCHA e PETRONI, 2017).

A parasitose é transmitida entre hospedeiros por fêmeas de flebotomíneos durante a hematofagia (STOCKDALE e NWETON, 2013). Os flebotomíneos são os vetores naturais de alguns agentes etiológicos causadores de doenças humanas e de animais, tais como protozoários do gênero *Leishmania* ross, 1903. O ciclo evolutivo de *Leishmania* spp. acontece durante o repasto sanguíneo, pela ingestão de macrófagos infectados com amastigotas. No trato digestivo do inseto, os macrófagos se rompem, e liberam o parasita, que se diferencia a promastigotas. Em seguida, o parasita migra para a faringe do inseto, podendo ser inoculadas em novo hospedeiro em um novo ciclo de repasto sanguíneo (SRIVASTAVA et al., 2016; QUEIROZ, 2019).

As leishmanioses apresentam duas formas clínicas principais: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral (LV) (ALMEIDA et al., 2020). A forma tegumentar é a mais comum podendo acometer pele e mucosas, autolimitadas (HAILU et al., 2016; ROCHA e PETRONI, 2017). A LV, também denominada calazar, é uma doença crônica grave, cuja letalidade pode alcançar 95% quando não se institui o tratamento adequado. É causada por espécies do complexo *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani*. No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania infantum* (= *Leishmania chagasi*) (DANTAS-TORRES, 2006) encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia (GONTIJO; MELO, 2004), típica de zonas rurais e em amplo processo de urbanização, apresentando cerca de 90% dos casos na região Nordeste (COSTA et al., 2018). Afeta principalmente as pessoas mais vulneráveis, como crianças menores de cinco anos, idosos, pacientes com comorbidades e outras condições com como co-infecção *Leishmania*/ HIV, desnutrição, entre outras. É endêmica em 13 países das

Américas, onde foram registrados 67.922 novos casos de 2001 a 2020, com uma média de 3.400 casos por ano. Em 2020, do total de casos, 97% (1.933) foram notificados no Brasil, e os demais casos, na Argentina, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Venezuela e Uruguai (OPAS, 2021).

Na maioria das vezes, os casos de LV humana são precedidos por casos de LV em cães, sendo esses os principais reservatórios de *Leishmania* em ambiente não silvestre, contribuindo para a manutenção do ciclo da doença (ABBIATI et al., 2019; QUEIROZ, 2019). A eutanásia de cães soropositivos tem sido adotada como medida de controle. Entretanto, essa medida é comprovadamente falha devido, em parte, à baixa sensibilidade de testes diagnósticos, para identificação de cães verdadeiramente positivos (FERNANDES, 2013). Para controle da LV canina, recomenda-se o uso de coleiras impregnadas com deltametrina, combinada com a borrifação de inseticidas em domicílios como principal linha de ação indicada pelo Ministério da Saúde do Brasil (COSTA, 2020). Além disso, preconiza-se no Brasil alternativamente à eutanásia, o tratamento utilizando a miltefosina em animais infectados. No entanto, o tratamento é caro (R\$1400,00/formas farmacêuticas) e inacessível para muitos tutores. Isto posto, é importante a busca por opções terapêuticas ou vacinas seguras, efetivas e mais baratas. Importante ressaltar que o mercado PET movimentou em 2020 146 bilhões de dólares no mundo, sendo 40 bilhões apenas no Brasil, mostrando o potencial a ser alcançado com produtos destinados ao uso veterinário.

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 sistema imune adquirido; embora o primeiro seja o agente efetor da ação leishmanicida, é por meio do estímulo do segundo que o sistema imune inato consegue ser ativado (TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2005; SHARMA; SINGH, 2009.). Embora nas infecções causadas por agentes intracelulares, a resposta imune do tipo Th2 pode ser prejudicial, já que aumenta a susceptibilidade às infecções e permite a multiplicação do parasita e também em sua disseminação, a resposta protetora do tipo Th1 se mostra como uma forma mais potente de defesa concedida pelo sistema imune (HERNÁNDEZ-RUIZ & BECKER, 2006). Células do tipo Th1 e Th2 afetam diferentes células e influenciam qual será o tipo da resposta imune. Citocinas que são produzidas pelas células Th1 vão ativar macrófagos e participar da geração de células T, resultando em uma resposta imune mediada por essas células. Contrariamente, citocinas produzidas pelas células Th2 vão ajudar na ativação de granulócitos e na produção de anticorpos via células B. Com a mesma importância, cada subpopulação pode exercer influências inibitórias uma em relação à outra (MAYER, 2012). As citocinas do tipo

Th1, como IFN γ e TNF α , participam na regulação do granuloma e fazem a ativação de macrófagos para aumentar sua capacidade microbicida, além de ajudar na indução de uma resposta humoral com os isotipos IgG1 e IgG3 em humanos (IgG2a em camundongos), enquanto que as citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, regulam a produção de IgE pelos linfócitos B que participam da ativação de reações de hipersensibilidade imediata (HERNÁNDES-RUIZ & BECKER, 2006).

Essas citocinas são resultado de uma apresentação de antígenos de patógenos por meio das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As moléculas de MHC apresentam fragmentos peptídicos de antígenos proteicos clivados dentro das moléculas às células. O MHC de classe I (MHC I) é expresso pela maioria das células nucleadas e importante para a apresentação de peptídeos de antígenos citoplasmáticos para as células T citotóxicas do tipo CD8⁺. O MHC de classe II (MHC II) é expresso por células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B e importante para a apresentação de fragmentos peptídicos de antígenos do fagolisossomo que são digeridos para células T CD4⁺, ajudando a decidir como proceder com uma possível resposta imune (WU et al., 2021). Então, após a inoculação da *Leishmania* na pele e fagocitose macrofágica, nos indivíduos que não têm a capacidade de produzir IFN- γ e ativar macrófagos, a *Leishmania* dissemina-se e, dependendo da espécie, causam a LV ou a LC. Nesses pacientes é fácil entender o desenvolvimento da doença, pela deficiência de IFN- γ e alta produção de IL-10. A restauração da resposta imune *in vitro* na LV pode ser observada pela neutralização de IL-10 ou pela adição de IL-12 às culturas de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) (MACHADO; ARAÚJO; CARVALHO; CARVALHO, 2004)

Apesar do curso da infecção geralmente ter os linfócitos T auxiliar (CD4⁺) como as moléculas de maior importância na produção de respostas do tipo Th1, os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) também podem ter participação neste processo (HOLADAY; SADICK; WANG; REINER et al., 1991; NYLÉN; GAUTAM, 2010). Após o contato com os antígenos do parasita, expressos na membrana do macrófago infectado, e dependendo do tipo de célula apresentadora de antígeno (APC), os níveis de citocinas endógenas e a natureza do antígeno reconhecido, as células T CD4⁺ e CD8⁺ proliferam e secretam um padrão de citocinas definidas com diferentes funções efetoras. Os linfócitos B, por sua vez, atuam na interação com os linfócitos T auxiliares, agindo como APCs iniciais da resposta imune, como mecanismo facilitador da sua própria ativação e diferenciação. Sendo assim, essa interação vai contribuir na produção de citocinas e também de outros fatores que facilitam a polarização para resposta Th1 ou Th2 (RODRIGUEZ-PINTO, 2005; CRAWFORD; MACLEOD; SCHUMACHER; CORLETT et al., 2006).

Além de serem células apresentadoras de antígeno, os linfócitos B também são responsáveis pela resposta humoral. Sua principal função é a defesa do hospedeiro por meio da secreção de anticorpos que reconhecem as moléculas antigênicas dos patógenos, a regulação negativa de respostas inflamatórias e a regulação de respostas contra auto-antígenos. Outra função importante dos linfócitos B é seu papel como células imunorreguladoras. As células B secretam citocinas e influenciam a ação de outras células, regulam a organização e a neogênese dos tecidos linfóides, a reparação de tecidos danificados pela inflamação e também influenciam a imunidade antitumoral, principalmente com as células T CD4⁺ às quais apresentam antígeno. As células B são heterogêneas e podem ser classificadas de acordo com as citocinas as quais elas produzem. As células B reguladoras são uma subpopulação de células B que fazem a manutenção da tolerância e limitam as respostas inflamatórias através da secreção da citocina IL-10, que inibe as citocinas pró-inflamatórias e promove a diferenciação das células T CD4⁺ em células reguladoras (COHEN; EMERY; GREENWALD et al., 2006; MARTÍN; ESCUDERO; RODRÍGUEZ; MARTÍN, 2013).

1.3 O controle das leishmanioses: tratamento e vacinas

Há poucos fármacos disponíveis para tratamento das leishmanioses, os quais apresentam alta toxicidade e baixa eficácia. Quando a questão é o tratamento de leishmaniose visceral canina (LVC), sabe-se que a cura clínica e parasitológica raramente é alcançada. (LAMOTTE et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019).

Os antimoniais pentavalentes são a primeira linha de tratamento, porém seu uso tem sido restrito devido a grande variedade de efeitos colaterais como cefaléia e dores no corpo, até efeitos mais graves como hepatite, pancreatite, insuficiência renal e cardiopatia (NEVES, 2008). Como fármaco de segunda escolha, temos a anfotericina B, podendo levar ao desenvolvimento de efeitos colaterais também graves, como o comprometimento renal (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; BRITO, 2019).

Em cães, a terapia medicamentosa com miltefosina foi aprovada pelo Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016) para o tratamento de LVC, sendo o único fármaco autorizado para o tratamento canino no Brasil. Embora a associação da miltefosina com alopurinol parece manter baixa a carga parasitária de animais infectados, mostrando-se uma boa associação candidata para o tratamento de LVC, a resistência induzida ao uso do alopurinol é um problema (MANZILLO et al., 2009; YASUR-LANDAU et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019; NOGUEIRA et al., 2019; AYRES et al., 2022).

1.3.1 O controle da LVC: as vacinas

No Brasil, existe apenas uma vacina contra a LVC disponível comercialmente, a Leish-Tec[®] (Ceva Animal Health) que utiliza a proteína A2 recombinante juntamente com saponina na sua composição. O objetivo da vacinação contra a LVC é duplo: redução do risco de um cão vacinado individual sofrer da doença e redução do risco de transmissão subsequente do parasita. Importante destacar que não há até o momento comprovação de que a Leish-Tec[®] induza uma resposta imune predominante Th1 forte e duradoura, na prevenção e progressão da doença em cães (MENDES, 2016; DANTAS-TORRES et al., 2020).

Uma outra vacina autorizada na Europa para controle da LVC é a CaniLeish[®] (Virbac, França), formulada com LiESP e a fração de saponina QA-21 (Mendes, 2016). Esta vacina induz uma resposta mediada por células de perfil Th1 apropriada logo após completar o curso primário, e essa resposta efetivamente reduz a infecção por *L. infantum* em macrófagos *in vitro*. Quando administrado em cães de áreas endêmicas, a vacina é capaz de diminuir aproximadamente quatro vezes o risco de um cão individual progredir para infecção ativa sintomática (MORENO et al., 2012; BONGIORNO et al., 2013). As desvantagens no tratamento clínico da LVC e a escassez de formulações vacinais com resultados positivos faz com que o desenvolvimento de novos tratamentos ou vacinas seja essencial, para o controle da doença em cães e, desta forma, diminuir a disseminação da doença em humanos (GILLSEPIE et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018).

Na literatura científica já foi descrito um grande número de antígenos candidatos a componente de uma vacina contra LV, desde antígenos do parasita inteiro morto ou atenuado (DANESHVAR et al., 2014), frações de antígenos do protozoário (BORJA-CABRERA et al., 2002; OLIVA et al., 2014; LAURINDO 2021), até antígenos recombinantes (POOT et al., 2006; FERNANDES et al., 2008) para serem administrados como proteína em combinação com um adjuvante ou como DNA codificante (Mendes, 2016). As vacinas produzidas a partir de antígenos recombinantes mostram-se efetivas na ativação do sistema imunológico e na manutenção da proteção em modelos experimentais (camundongos e cães) (Kaur et al., 2011) e em humanos (fase I dos ensaios clínicos) (Chakravarty et al., 2011).

1.4 Estudos de potencialização de ativação de resposta imune ao promover implementações da formulação vacinal e na estrutura de peptídeos

Os adjuvantes vacinais são importantes componentes na fabricação de vacinas e têm sido utilizados com o propósito de melhorar a qualidade das mesmas, reduzindo

riscos e aumentando sua eficiência. Um adjuvante é uma substância que é adicionada a uma vacina para estimular e aumentar a magnitude e a durabilidade da resposta imune do hospedeiro contra o antígeno vacinal (SINGH E O'HAGAN, 2003). Os adjuvantes são classificados em dois grupos, os imunoestimuladores que mimetizam moléculas altamente conservadas dos patógenos, que ativam diretamente às APC e outras células imunes através de receptores celulares, como os *Toll-like* (TLR), agonistas de receptor de lectina tipo C e outros receptores e, os sistemas de liberação de antígenos às APC, como os lipossomas, emulsões, nanopartículas, complexos imunoestimulantes (ISCOMs) entre outros (O'HAGAN E VALIANTE, 2003).

Apesar de seu uso ainda ser restrito em seres humanos, os adjuvantes são utilizados amplamente na veterinária. O desenvolvimento de novos adjuvantes vacinais tem sido descrito como um dos processos mais lentos da história da medicina (FERREIRA et al., 2013; PULENDRAN et al., 2021). O Montanide™ Gel 01 é um adjuvante polimérico desenvolvido para melhorar a segurança e eficácia das vacinas de DNA, fornecido pela *Seppic* (Puteaux, França) e utilizado a 10% conforme recomendação dos fabricantes. É adjuvante à base de água desenvolvido recentemente para melhorar a eficácia da vacina com características aquosas. Observou-se que o uso de Montanide™ Gel 01 como adjuvante deu resposta imune de maneira precoce suficiente em bovinos vacinados, associada a um perfil de segurança, qualquer que seja a natureza do antígeno, e foi relatado que os anticorpos induzidos foram mais elevados do que as de vacinas à base de alumínio e, portanto, pode ser usado associado a um amplo conjunto de meios antigênicos e recomendado como adjuvante para vacinas de animais sensíveis (PENEBRA and LILLEHOJ, 2019; ABD EL RAHMAN et al., 2020).

Além de adjuvantes vacinais vários tipos de formulações farmacêuticas com sistemas de entrega de medicamentos (DDS) foram desenvolvidos para auxiliar no tratamento de pacientes, juntamente com melhorias na eficácia na entrega desses fármacos e segurança do DDS (DUNCAN, 2006; FENSKE e CULLIS, 2008; ZHANG et al., 2008; SLINGERLAND et al., 2011). A ciência analítica tem um papel importante no desenvolvimento de produtos farmacêuticos nessa vertente de sistemas transportadores, como lipossomas (GOMEZ-HENS e FERNANDEZ-ROMERO, 2006; OHNISHI; YAMAMOTO et al., 2012). Lipossomas são estruturas esféricas fechadas, constituídas por uma bicamada de fosfolípidios que envolvem um compartilhamento aquoso interno. Um composto que seja farmacologicamente ativo pode interagir com esta estrutura localizando-se, se for muito hidrossolúvel, no interior hidrofílico, ou no interior da bicamada, isso em casos de compostos mais lipofílicos ou ainda podendo localizar-se numa situação intermediária. Estas estruturas têm sido estudadas ao longo dos anos, com bastante intensidade, como carregadores de fármacos, já que os lipossomas podem evitar a rápida absorção dos antígenos pelos macrófagos

no sistema reticuloendotelial e circular na corrente sanguínea por um tempo relativamente longo (SHARMA & SHARMA, 1997; CONCEIÇÃO; TORCHILIN, 2005; MATOS; MOUTINHO, 2009).

Além dos fosfolipídios, a adição de colesterol também tem sido aplicada para proporcionar maior flexibilidade dos lipossomas, proporcionando a criação de espaços entre os fosfolipídios. A natureza, a estrutura química, a proporção empregada dos fosfolipídios e a técnica utilizada em seu preparo podem influenciar tanto as características morfológicas quanto as características físico-químicas dos lipossomas, como tamanho de partículas, estabilidade, carga superficial, número de bicamadas, entre outros (DAWOUD et al., 2019; PALLAGI et al., 2019; GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020; LUIZ, 2022). Tendo isso em mente, de acordo com Treuel et al., (2014) a etapa de produção e caracterização dos lipossomas é essencial para assegurar a sua atividade terapêutica, já que as variações nas propriedades físico-químicas de nanocarregadores podem influenciar em sua atividade biológica. Então, dependendo dos métodos de preparo, diferentes tipos de lipossomas podem ser obtidos. De maneira geral, eles podem ser classificados de acordo com a sua carga de superfície (catiônico, aniônico ou neutro), tamanho e números de bicamadas (DAWOUD et al., 2019; PALLAGI et al., 2019; GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020; LUIZ, 2022).

Existem estudos de pequenas sequências de resíduos de aminoácidos que têm a capacidade de agirem como adjuvantes, que são chamados adjuvantes sintéticos. O uso de adjuvantes sintéticos é uma abordagem mais segura e considerada um avanço em relação aos métodos tradicionais de vacinação. RS09 (APPHALS) serve como um excelente adjuvante e tem sido usado em muitos estudos anteriores (MOYLE and TOTH, 2013; GUPTA et al., 2020; ONILE et al., 2020; KHAN et al., 2020; TARANG et al., 2020). O RS09 é um agonista de TLR-4, sendo assim, o envolvimento desse peptídeo adjuvante permite que epítomos que reconhecem os linfócitos citotóxicos T CD8⁺ (CTL) sejam co-estimulados, resultando em uma ativação imune mais robusta (REHMAN et al., 2021).

1.5 Lc24 e produção de vacina de peptídeos

Vacinas de peptídeos sintéticos que induzem imunidade por causar uma ativação em células T e B são a grande promessa na prevenção e terapia de doenças infecciosas (VAN DER BURG et al., 2006) e vêm sendo usados em protocolos de vacinação contra patógenos extracelulares e intracelulares (HARLOW, et al., 1988; THOMPSON, et al., 1994; LINDBERG, 1999). Peptídeos são formados pela união entre dois ou mais resíduos de aminoácidos. Isso ocorre por uma reação de condensação envolvendo um grupo α -carboxílico de um aminoácido e um grupo α -amínico de outro, formando ligação peptídica (BENITES,

2017). Peptídeos sintéticos são fáceis de produzir em escala industrial, não possuem potencial de integração ou recombinação genética. Apesar de alguns casos na literatura confirmarem que são quimicamente estáveis, não precisando de condições especiais de armazenamento, mas a estabilidade química e física podem ser comprometidos por fatores internos, como a temperatura e pH, bem como por contaminantes e impurezas de excipientes. O que significa que a produção e formulação de vacinas peptídicas necessitam de atenção especial para a sua eficácia e segurança (JACKSON, et al., 2006; MACHADO, 2010; CALIXTO, 2013).

Fatores intrínsecos, incluindo propriedades hidrofóbicas, hidrofílicas, tamanho, carga, e fatores extrínsecos como pH, sua carga iônica e presença de sais, e interação com outros componentes afetam a solubilidade de proteínas e consequentemente dos peptídeos provenientes da mesma (FARIAS, 2017). Portanto é importante que para a síntese em fase sólida do peptídeo que é um candidato a imunizante seja utilizado uma sequência de resíduos de aminoácidos que tenha uma solubilidade alta. O método denominado síntese de peptídeos em fase sólida, tem como base o fato do grupo carboxílico do aminoácido C-terminal de uma cadeia peptídica, se encontrar unido covalentemente a um polímero e, portanto, o componente que contém esta extremidade é insolúvel nos solventes utilizados no processo de síntese. E então, o excesso de reagentes e a maioria dos produtos secundários podem ser eliminados por simples filtração e lavagens do polímero que contém o peptídeo em crescimento. Isto influencia favoravelmente a síntese e proporciona excelentes rendimentos (ANDREU; RIVAS, 1997; BENITES, 2017).

Além de todas as questões de escolha do imunizante em uma vacina peptídica e sua síntese, outros parâmetros também devem ser avaliados para uma eventual formulação. Este antígeno precisa ser avaliado quanto suas características antigênicas, não alergênicas, imunogênicas, não tóxicas, conservadas e se possuem boa cobertura populacional para linfócitos T ($CD8^+$ e $CD4^+$) e linfócitos B, além de checar se a sequência escolhida do imunizante já não está presente no genoma do alvo a ser imunizado pois já seria algo de conhecimento do sistema imunológico desses animais, ou seja, não seria um antígeno (SILVA, 2022). Para isso existem servidores computacionais onde ao ser feito um estudo de imunoinformática são amplamente utilizados. Os servidores IEDB Cells e ABCpred são utilizados na literatura como os principais servidores para prever peptídeos com capacidades antigênicas e imunogênicas que sejam ligantes de linfócitos B (JESPERSEN et al., 2017; SAHA and RAGHAVA, 2006). Como também para linfócitos do tipo T; para aqueles que estimulam resposta do tipo T $CD4^+$, é utilizado como principal servidor o EpiDOCK que mostrará se os peptídeos em análise no estudo de predição vão ter capacidade de reconhecer células do tipo MHC de classe II e produzir uma resposta imune esperada (DHANDA et al., 2013), e também

para a resposta da indução de linfócitos do tipo T CD8⁺, que reconhecem epítomos de MHC de classe I que podem ser avaliados quanto ao seu reconhecimento dessas células utilizando o servidor NetMHCpan (HOFFMAN; SHAN; KRIEGER, 2021).

Neste contexto, um transportador do tipo ABC, LINF_240020050, de 3372 aminoácidos, vem sendo alvo de estudos pelo nosso grupo quanto ao seu potencial uso no diagnóstico da LVC. Isabel, 2010 realizou um mapeamento desta proteína, identificando regiões de epítomos de reconhecimento para as células B. Neste estudo, uma região de 208 aminoácidos, denominado Lc24, foi selecionada e caracterizada quanto às suas propriedades antigênicas, a qual foi explorada neste trabalho para caracterização das propriedades imunogênicas, no contexto de desenvolvimento de uma nova vacina para controle da LVC.

2 OBJETIVO

Avaliação do potencial imunogênico e protetor da proteína Lc24 de *L. infantum* em estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de uma vacina para controle da leishmaniose visceral.

Os objetivos específicos do projeto são:

- Expressar e purificar em sistema de expressão heterólogo a proteína recombinante MBP::Lc24 (Isabel, T. 2010):
 - Amplificar e clonar Lc24 no vetor pMAL-p5x para expressão em fusão com proteína *Maltose Binding Protein* (MBP) em *E. coli*;
- Mapear e selecionar regiões de epítomos para síntese de peptídeos derivados da proteína Lc24;
 - identificar sequências com potencial imunogênico;
- Sintetizar peptídeos derivados de Lc24 contendo regiões de epítomos;
- Avaliar o potencial imunogênico e de antígenos derivados de Lc24 utilizando o modelo experimental BALB/c;
 - Encapsular peptídeos sintetizados em lipossomas aniônicos;
 - Imunizar camundongos com o peptídeo derivado de Lc24;
 - Determinar os níveis de IgG específicos e subclasses IgG1 e IgG2a;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss 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. Os 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 nº 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 nos quadros abaixo:

Quadro 1. Linhagens e genótipos de *Escherichia coli*. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>E. coli</i> TOP10	hsdR, mcRA, lacZΔM15, endA1, recA1	<i>E. coli</i> genotypes-Open Wet Ware
<i>E. coli</i> BL21	(F ⁻ dcm ompT hsdS(rB – mB –) gal)	

Quadro 2. Linhagens e genótipos de bactérias. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>E. coli</i> BL21 Codon Plus	F-ompThsdS (rB-mB-) dcm+TetrgalendAHte [argUproLCamr]	<i>E. coli</i> genotypes Open Wet Ware
<i>E. coli</i> Rosetta	F- ompThsdSB(RB- mB-) gal dcmλ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Camr)	

3.4 Meios de cultura

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

LB (Luria Bertani) pH 7,5; Triptona 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 5 g.L⁻¹; e NaCl 5 g.L⁻¹, quando necessário meio sólido ágar 15g.L⁻¹ foram adicionados. O meio foi autoclavado 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⁻¹; tampão Hepes 9,9 mmol.L⁻¹; Soro fetal bovino 10%; estreptomicina 100 µg.mL⁻¹, penicilina 100 U.mL⁻¹. Filtrado em membrana de 0,22 µm (Kasvi®).

3.5 Sequências

A sequência completa de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína em estudo (ID de acesso LINF_240020050) foi obtida do sítio TriTrypDB, Kinetoplastid Genomics Resource (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>), acesso em 16 de agosto de 2022.

3.6 Extração de DNA genômico (gDNA)

O 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. Posteriormente o gDNA foi quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop Lite Spectrophotometer* (Thermo Scientific), analisado em gel de agarose 1% para verificar a integridade da amostra e armazenado a -20 °C.

3.7 Amplificação por PCR

A proporção de cada reagente para o mix da PCR ocorreu da seguinte maneira: 500 ng de gDNA, 2,5 µL de tampão (10x), 0,5 µL de DNTp (10 mM), 1,25 µL do *primer forward* (Fw) (10 µM), 1,25 µL do *primer reverse* (Rv) (10 µM), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µL da enzima Taq Polimerase Pfu (Thermo Fisher) e o restante foi adicionado água milli-Q para um volume total de 25 µL de solução. A reação ocorreu da seguinte forma: 94°C por 3 min; 35 ciclos de: 94°C por 1 min, 55°C por 30 s e 72°C por 1 min; 72°C por 3 min; 72°C por 7 min e 4°C por tempo indefinido em termociclador *Amplitherm Thermal Cycler* (Ideal Lab®). Os primers utilizados estão detalhados no Quadro 3.

Quadro 3: *Primers* para a PCR performada em todas as estratégias de clonagens. Fonte: Elaborada pelo autor 2022.

Primers	Sequência de pares de base
P.FwLc24_64 5pb	AAACCATGGAACTGGTGCCGCGCGGCAGCCTGGGGGGCAAGAATCACCA C
P.RvLc24_645 pb	AAAGATATCTCAGTGATGTGATGATGATGATGGTGGCGAATGTACCAAA GCAGC

Azul claro - sítio de restrição *Nco*I; amarelo escuro - Trombina; azul - sítio de restrição *Eco*RV; laranja - cauda de histidina; vermelho - regiões codificadoras do fragmento Lc24.

3.8 Eletroforese em gel de agarose, manipulação e purificação de DNA

Para a confirmação da amplificação da ORF Lc24 foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo (10 mg/mL), em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-Acetato; 2 mM de EDTA, pH 8,5) sob uma tensão de 3V/cm (Fonte BioRad) e visualizado sob incidência de luz ultravioleta (UV) e as imagens foram capturadas e registrada utilizando o fotodocumentador (Loccus Biotecnologia-molecular Imaging). De acordo com as especificações dos fabricantes de cada enzima utilizada neste projeto, pode ser feita as reações de digestão, desfosforilação e ligação de DNA. Para a purificação do DNA foi utilizado o kit *PCR Purification Kit* (Cellco Biotecnologia®), de acordo com as especificações do fabricante.

3.9 Transformação bacteriana

Para a expressão da proteína Lc24, transformou-se as linhagens de *E. coli* Rosetta e BL21 Codon Plus de acordo com o protocolo descrito por (Miller and Nickolof, 1995) com algumas modificações, como descrito a seguir: 2 mL da cultura crescida *overnight* foram adicionadas em 250 mL de LB; 15 min no gelo; Tempo de centrifugação de 15 min a 3000 x g; Lavagem das células com água milli-Q gelada estéril foi feita três vezes.

Transferiu-se, todo o volume existente nos microtubos (bactéria eletrocompetente + volume da ligação) para cubetas de eletroporação que já estavam sendo resfriadas em gelo. Foi realizada a eletroporação utilizando o eletroporador *Nucleofector™ 2b Device* (Lonza Biosciences). O conteúdo das cubetas foi homogeneizado com meio LB e transferido para novos microtubos que, posteriormente, foram incubados em banho-maria a 37°C por 1 h. Então, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido LB + 100 µg/mL de ampicilina e incubadas em estufa a 37°C *overnight*.

3.10 Extração de DNA plasmidial (pDNA)

Algumas das colônias de bactérias transformantes foram inoculadas em 5 mL do meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. As bactérias inoculadas foram incubadas por 16 h em *Shaker* a uma temperatura de 37°C e 250 rpm, para posterior extração do pDNA. Deste pré-inóculo foi transferido 1,5 mL para um microtubo e a extração do pDNA foi feita utilizando o kit *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit* (Cellco Biotecnologia®) conforme especificações do fabricante e armazenado em 25 µL de Elution Buffer, proveniente no kit, quantificado em espectrofotômetro NanoDrop Lite Spectrophotometer (*Thermo Scientific™*) e conservado à -20°C.

3.11 Sequenciamento

Após isso, a fase aberta de leitura foi confirmada por sequenciamento no equipamento ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer com o *Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*) e os *primers* P.Fw_pMAL-Thrombin-Lc06: 5' AAACCATGGAAGTGGTGCCGCGCGGCAGCCCGCTATCAGTGCTGCGTACTC 3' e P.Rv_pMAL-Lc06: 5' AAAGATATCAGCGATTCTGAACGAACCCAC 3'. Estas análises foram realizadas pelo Laboratório de Análises Biomoleculares Multiusuário, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, campus Araraquara.

3.12 Expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Para a expressão da proteína Lc24, transformou-se as linhagens de *E. coli* Rosetta e BL21 Codon Plus. Foram preparados pré-inóculos (10 mL cada) de colônias ampicilina resistentes *overnight* em Incubadora *Shaker* (CIENLAB) a 37°C e 250 rpm, utilizando uma colônia transformante de cada cepa. Destes pré-inóculos foram preparados os inóculos (100 mL) que foram incubados a 37°C a 250 rpm até a densidade ótica (DO) atingir 0,5 (~ 4 horas). Ao atingir a DO, 20 mL de cada cultura foram separados e aos outros 80 mL de cada cultura adicionou-se 0,3 mM de IPTG (de acordo com o manual pMAL *Protein Fusion & Purification System - Instruction Manual*) para a indução da expressão. A indução foi realizada na temperatura de 37°C e 250 rpm por cerca de 18 h. Todas as culturas foram centrifugadas a 6000 x g durante 20 min e os pellets foram armazenados a - 20°C até o momento do uso.

3.13 Extração de proteína

Para o rompimento, os pellets foram ressuspensos em tampão PBS. As células foram sonificadas por meio de 10 ciclos de 15 s sonicando e 10 s em repouso (Ultronique, Eco-sonics Modelo: DESRUPTOR), depois os extratos foram centrifugados a 6000 x g por 20 min com sobrenadante e pellet armazenados em -20°C. Para a certificação da expressão da proteína Lc24, com cerca de 70 KDa, os lisados foram resolvidos em géis SDS-PAGE (7,5% - 10%).

3.14 Western Blot

Os géis SDS-PAGE que foram usados para fazer a certificação da expressão da proteína foram armazenados em água a 4-8°C até o momento de seu uso. A transferência para a membrana de PVDF foi feita utilizando o aparelho *Trans-blott® Turbo™ Transfer System* (Bio Rad) a 25 A e tensão crescente até 25V por 7 min. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1 h com solução 3% BSA em PBS e posteriormente incubada a temperatura ambiente sob agitação com anticorpo anti-6His (Sigma-Aldrich) durante 1 hora. Posteriormente, ocorreram 3 lavagens com solução PBST (1,4M NaCl, 30mM KCl, 100mM Na₂HPO₄, 20mM KH₂PO₄ e 0,05%Tween20), após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo de camundongo conjugado com HRP durante mais 1 hora. Após mais três lavagens com a solução PBST, foi-se revelado com solução *1-Step Ultra TMB-Blotting* (Bio Rad).

3.15 Predição de epítomos

Para prever esses epítomos na proteína Lc24 foram utilizados dois programas, BepiPred-2.0 (JESPERSEN et al., 2017), contido no servidor IEDB Cells (<http://tools.iedb.org/bcell/>, acessado em 15/06/22) e ABCpred (SAHA and RAGHAVA, 2006). O servidor BepiPred-2.0 prevê epítomos de células B a partir de uma sequência de proteína, usando um algoritmo Random Forest treinado em epítomos e aminoácidos não epítomos determinados a partir de estruturas cristalinas (JESPERSEN et al., 2017). Os resíduos com pontuações acima do limite 0.5 (limiar de positividade padrão) são previstos como parte de um epítopo. O servidor ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>, acessado em 15/06/22), utiliza um banco de dados e uma rede neural artificial para predição de possíveis epítomos para células B (Saha and Raghava, 2006). Sequências peptídicas sobrepostas pelos dois métodos usados foram consideradas como potenciais epítomos lineares de células B.

3.15.1 Predição de epítomos de célula T CD4⁺

As sequências aminoacídicas em formato FASTA dos epítomos de células B sobrepostos, foram submetidos ao servidor EpiDOCK (<http://www.ddg-pharmfac.net/epidock/EpiDockPage.html>, acessado em 15/06/22) para prever a presença de epítomos de células T CD4⁺. O EpiDOCK prevê a ligação de 23 alelos humanos MHC classe II mais frequentes, 12 alelos HLA-DR, 6 HLA-DQ e 5 alelos HLA DP. Adicionalmente usamos a base de dados IFNepitope (Dhanda et al., 2013) para conferir se os epítomos de células TCD4⁺ identificadas nas sequências sobrepostas, são produtores de IFN- γ . O servidor de epítomos de IFN prevê epítomos de IFN- γ de proteínas selecionadas de ZIKV usando algoritmos híbridos SVM juntamente com Motif (DHANDA et al., 2013).

3.15.2 Predição de epítomos de célula T CD8⁺

Assim como os epítomos de células T CD4⁺, também a resposta imune envolvendo epítomos de células TCD8⁺ têm contribuído na defesa contra *Leishmania* spp (GAUTAM et al., 2022). Deste modo, as sequências sobrepostas selecionadas foram analisadas em relação à presença de epítomos de células T CD8⁺, os quais se ligam a MHC classe I. Para essa predição usamos o servidor NetMHCpan 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>, acessado em 15/06/22). Neste estudo foi programado para encontrar ligantes dos alelos H2-Db, H2-Dd, H2-Kb, H2-Kd e H2-

Ld, em um threshold de 0.5 para *strong binder* e 2.0 para *weak binder*, e um filtro de threshold por porcentagem de rank de -99. Na análise foram usados os alelos H-2Kb, H-2Kd, H-2Db, H-2Dd e H-2Ld.

3.15.3 Predição de imunogenicidade, toxicidade e alergenicidade

As propriedades imunogênicas de cada sequência foram analisadas no servidor Vaxijen 2.0. A página de resultados desse servidor mostra a probabilidade do antígeno (como uma fração de unidade) para cada proteína e uma declaração de status do antígeno como “provável antígeno” ou “provável não antígeno” baseado em propriedades físico-químicas dos peptídeos. Os servidores ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php>, acessado em 20/06/22) e AllerTOP v. 2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>, acessado em 20/06/22) foram utilizados para antecipar, respectivamente, a toxicidade e efeitos alérgicos das sequências peptídicas selecionadas.

3.15.4 Predição de similaridade com proteoma de cães

A presença ou ausência de similaridade das sequências peptídicas selecionadas com o proteoma de cães foi analisada usando o programa de PIR (*Protein Information Resource*) (<https://proteininformationresource.org/>, acessado em 21/06/22). Esta estratégia permite excluir as sequências peptídicas vacinais que devido a sua homologia com proteínas do hospedeiro-podem gerar respostas autoimunes.

3.15.5 Caracterização das propriedades físico-químicas dos peptídeos em estudo

Parâmetros físicos-químicos como ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM), hidrofobicidade (GRAVY) e o tempo de vida média dos peptídeos selecionados foram preditas usando programa ProtParam do servidor ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam>, acessado em 21/06/22) e o Peptide Property Calculator (Innovagen) (<https://pepcalc.com/>, acessado em 21/06/22).

3.15.6 Seleção e desenho do imunógeno peptídico

Após análise integrada de todas as propriedades imunológicas e físico

químicas das sequências peptídicas selecionadas, a sequência HKPGGDAGRRGGAQKT, nomeada com as duas primeiras letras do nome do autor (GD), ano de início da síntese (21) e numeração para diferenciar peptídeos sintetizados com o início da sigla, portanto GD2102, foi escolhida para avaliar a sua imunogenicidade em camundongos. O peptídeo adjuvante RS09, com sete resíduos (APPHALS) (MOYLE and TOTH, 2013; GUPTA et al., 2020) de comprimento foi adicionado à sequência do peptídeo GD2101 na extremidade N-terminal, juntamente com dois resíduos de arginina (R) como espaçadores. Uma Valina (V) também foi adicionada na extremidade N-terminal. A sequência aminoacídica do imunógeno peptídico desenhado foi denominada GD2202 (Figura 1)

Figura 1. Representação esquemática do imunógeno peptídico desenhado. O imunógeno desenhado está composto por uma Valina na extremidade N-terminal; o peptídeo adjuvante RS09; duas Argininas como espaçadores; peptídeo GD2102.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

3.16 Síntese de peptídeos

Para o presente estudo dois peptídeos foram sintetizados. A sequência de 16 resíduos de aminoácidos GD2102 (HKPGGDAGRRGGAQKT-NH₂) derivado da proteína Lc24, que foi alvo do estudo de Ferreira (2010) e a sequência GD2202 (VAPPHALSRRHKPGGDAGRRGGAQKT) (Figura 1). Contado com a parceria do laboratório de Síntese de estudos de Biomoléculas (LASEBIO), para a síntese desse peptídeo, cada aminoácido foi sintetizado em aparelho sintetizador automático Tribute-UV (*Protein Technologies*), que utiliza a metodologia de Merrifield (1963) em 737,0 mg de resina *Rink Amide* e os Fmoc-aminoácidos acoplados pela ativação dos grupos carboxilas com N,N-Metilformamida como agente acoplante e HBTU como o agente desacoplante, tudo isso feito com uma escala de 0,5 e excesso de 5x. Os reagentes citados foram utilizados em duas vezes de excesso em relação a quantidade de grupos reativos na resina inicial. O grupo Fmoc foi retirado pela lavagem em 20% v/v 4-metilpiperidina/DMF (dimetilformamida).

Para o acoplamento do peptídeo adjuvante RS09 e as duas Argininas como espaçadores (RR) e uma Valina, formando então o peptídeo GD2202 (VAPPHALSRRHKPGGDAGRRGGAQKT-NH₂) utilizou-se a mesma metodologia que o sintetizador

automático utiliza mas de maneira manual. Diferentemente do sintetizador automático, para a identificação de acoplamento e desproteção entre os resíduos de aminoácidos, e vice-versa, a resina foi lavada com DMF e foi realizado o teste de ninidrina (KAISER; COLESCOTT; BOSSINGER; COOK, 1970) para assim então poder detectar a presença de grupos amino livres, sabendo que em temperaturas elevadas ocorre uma reação entre a ninidrina e este grupo amino livre, o que gera uma coloração azul, sendo assim mostrando a eficiência da síntese.

3.17 Reação de clivagem dos peptídeos

Para a reação de clivagem do peptídeo da resina posteriormente a síntese, foi necessário a adição de ácido trifluoracético (TFA), 1,2-etanoditiol (EDT), triisopropilsilano (TIS) e água ultrapura (TFA 95%, EDT 2,5% e H₂O Mili-Q 2,5% v/v); em frasco de cintilação sob agitação branda durante 2 h. A precipitação do peptídeo e da resina foi realizada utilizando o éter etílico gelado, e posteriormente a três ciclos de sonicação e vortexando durante 30 s cada, esse procedimento foi repetido três vezes, e então centrifugado por 4 min e então o sobrenadante foi descartado. A separação entre o peptídeo e resina se deu por solubilização do peptídeo em solução de H₂O Mili-Q contendo TFA 0,045% v/v acetonitrila contendo TFA 0,036% v/v, sendo vortexado e sonicado em três ciclos de 30 s, esse procedimento repetido três vezes e então centrifugado para separar o peptídeo da resina. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

3.18 Purificação e caracterização dos peptídeos

Os produtos obtidos no processo de clivagem foram purificados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) em modo semi-preparativo, utilizando o solvente A (H₂O, TFA 0,045%) e solvente B (ACN, TFA 0,036%), a um fluxo de 5 mL.min⁻¹, comprimento de onda para detecção a 220 nm, e uma coluna de C18, 250 mm x 10 mm, =300 Å, tamanho da partícula de 5 µm (Phenomenex). Para a purificação do peptídeo GD2202 foi usado um gradiente de X-Y% de solvente B em 90 min; e o peptídeo GD2102 foi purificado em gradiente de 5-20% de solvente B em 90 min.

Após a 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 Ultraspehere 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 mL.min⁻¹.

As análises de massas moleculares dos peptídeos foram realizadas em espectrometria de massas em espectrômetro de massa Bruker injeção ion trap, modo eletrospray positivo (M+H)⁺ na faixa de 200-2000 g.mol⁻¹, para confirmar a obtenção do material desejado. A concentração de proteína foi medida usando o ensaio de proteína de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce) utilizando o kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)* de acordo com as instruções do fabricante.

3.19 Preparação da formulação vacinal Gel01/GD2202

Imunógeno: peptídeo GD2202 como imunógeno vacinal;

Adjuvantes: Dois tipos de adjuvantes foram utilizados: o adjuvante Montanide™ Gel 01 (SEPPIC, França), e um lipossoma de composição aniônica (Descrição no item 3.21). O Gel01 está composto por uma dispersão de partículas micro-esféricas altamente estáveis de poliacrilato de sódio em água.

3.20 Formulações vacinais

O peptídeo GD2202 (1 mg) foi formulado com Gel01 (10%) em PBS. A mistura foi deixada em agitação durante 40 min, 5 x g à temperatura ambiente.

3.21 Desenvolvimento dos lipossomas

Com a colaboração da Dr^a Marcela Tavares, do Laboratório de Farmacotécnica o preparo dos lipossomas compostos por dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol, e (DSPE-PEG₇₅₀) (7:2:0,5, %mol) e peptídeo foi realizado utilizando o método de hidratação do filme lipídico descrito por Bangham et al. De acordo com esse método, os lipídeos foram solubilizados em 5 mL de clorofórmio e submetidos à rotaevaporação por 30 min a 150 rpm e 50°C para que ocorresse a formação de uma fina película. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado durante 30 min a 250 rpm com solução contendo peptídeo a 0,5 mg/mL (tampão fosfato, pH 7,4). Lipossomas brancos, sem a adição do peptídeo, foram produzidos como controle. As formulações foram submetidas a oito ciclos de extrusão em membranas de 200 e 100 nm (Avanti®).

3.22 Ensaio de viabilidade celular *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade celular das formulações contendo apenas o peptídeo GD2202, lipossomas contendo o peptídeo GD2202 e a formulação do peptídeo GD2102 + adjuvante Montanide™ Gel01 foi realizada em linhagem de fibroblasto murino (L929) utilizando o marcador de viabilidade celular resazurina. As células foram cultivadas em meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich Co, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich Co, USA) e 1% de solução de antibiótico (10.000 UI de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) (Sigma-Aldrich Co, USA). Após 80% de confluência, as células foram removidas dos frascos de cultivo utilizando tripsina (0,05%, v/v). Neste procedimento, 1×10^4 células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após adesão das células, o meio de cultivo foi substituído por 200 µL de meio de cultivo incompleto (DMEM sem adição de soro fetal bovino) contendo as amostras diluídas nas proporções de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160. Poços contendo células não tratadas e tratadas com DMSO (30% m/v) foram utilizados como controles negativos e positivo, respectivamente. Após 24 h de tratamento, os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS 1X), em seguida, foi adicionado 100 µL de meio de cultura contendo resazurina (0,015 mg/mL). As placas foram incubadas novamente a 37°C e 5% de CO₂ por 3 h. Após esse período, a leitura da viabilidade celular foi determinada em leitor de placas Biotek (modelo Synergy) utilizando o comprimento de onda de excitação de 570 nm e emissão de 600 nm.

3.23 Ensaio de imunização

Para a determinação da resposta humoral, em camundongos Swiss, com quatro grupos contendo cinco animais cada um foram submetidos à imunização por via subcutânea. Os grupos foram divididos da seguinte maneira; o primeiro grupo (G1), que foi o grupo controle, recebeu PBS (100 µL); o segundo grupo (G2) recebeu apenas uma solução do peptídeo GD2202 com PBS (100 µg/mL); o terceiro grupo (G3) recebeu uma solução de peptídeo (100 µg) + adjuvante Montanide™ Gel 01 (10% da solução) + PBS; o quarto grupo (G4) recebeu a formulação do peptídeo encapsulado em lipossomas (foi utilizado 1 mg de peptídeo GD2202 para a formulação de encapsulamento).

A imunização foi feita em um esquema de duas doses (volume total = 100 µL), sendo a primeira dose administrada no dia zero e a segunda no dia 14. Sete dias após a última imunização, os animais foram eutanasiados.

3.24 Obtenção do soro de camundongos

Após a eutanásia a sangria de cada camundongo se deu por punção cardíaca com seringas e agulhas estéreis/descartáveis. O sangue foi acondicionado em microtubo estéril de 1,5 mL, mantido a TA para que a coagulação acontecesse e em seguida incubados em estufa a 37°C por 20 min. O coágulo foi separado e o restante centrifugado a 1500 x g por 10 min, 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.

3.25 Resposta Humoral

Placas de 96 poços Nunc MaxiSorp™ foram sensibilizadas com os peptídeos (GD2102 e GD2202) à concentração de 10 µg/mL⁻¹ em tampão carbonato (0,1 mol.L⁻¹, pH 9,5) por 16 h a 4°C. A seguir, lavada três vezes com solução PBST (0,2% de Tween® 20), bloqueada com solução PBST 3% m/v BSA sob agitação (20 rpm) durante uma hora a TA. Os anticorpos primários obtidos dos camundongos imunizados foram diluídos em solução PBST 1,5% m/v BSA na razão de 1:100 e incubados por 2 h em estufa a 37°C. As placas então foram novamente lavadas com PBST três vezes para proceder a incubação dos anticorpo secundário anti-mouse IgG produzidos em cabra, conjugado com Peroxidase (Sigma) por uma hora em estufa a 37°C e, em seguida, revelado com solução reagente A e B (BD OptEIATM) na proporção de 1:1 por 30 min na ausência de luz, a reação foi parada utilizando H₂SO₄ e seguido de leitura da absorbância a 450 nm em leitor de microplacas multimodal de absorbância Infinite® M200 PRO (Tecan).

3.25 Análise estatística

Para realização da análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 8. A análise de variância (ANOVA) foi realizada 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

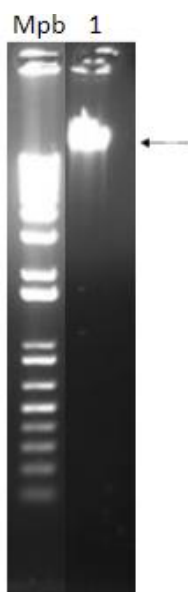
4.1 Obtenção da proteína Lc24 para estudos de imunogenicidade

Estudada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, a proteína recombinante Lc24 truncada (624 pb) mostrou um grande potencial antigênico. Isabel (2010), embora tenha obtido resultados promissores em ensaios de immunoblotting, a proteína recombinante expressa no vetor pET-42a apresentou baixa solubilidade. Portanto, outras vias para expressão da proteína Lc24 mais solúvel utilizando outros vetores foi investigado nesta etapa do trabalho para posterior análise do potencial antigênico/imunogênico da proteína.

4.2 Clonagem do gene Lc24 de *L. infantum* em vetor pMAL_p5X

Nesta etapa do trabalho para que houvesse a clonagem da ORF Lc24, o DNA genômico (gDNA) de *L. infantum* foi extraído e quantificado. Analisando a integridade da amostra em gel de agarose (Figura 2), foi possível perceber que o processo de extração ocorreu com sucesso e, de acordo com a quantidade de amostra colocada dentro do poço, foi obtido uma quantidade relevante de gDNA. Esse material foi posteriormente guardado em local adequado até que fosse preciso usá-lo.

Figura 2. DNA genômico obtido de *L. infantum*. Eletroforese de gel de agarose (1%) para avaliar a qualidade do gDNA obtido utilizando-se o Kit PureLink™. Mpb. Marcador de pares de bases 1kb *Plus Ladder* (Invitrogen). 1. DNA genômico de *L. infantum* (10 µL).

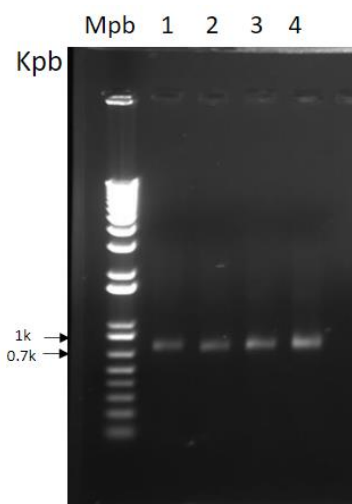


Fonte: Elaborado pelo Autor (2022).

4.3 Amplificação da sequência codificadora de Lc24

A clonagem da sequência nucleotídica de Lc24 foi planejada pautando-se em apenas dois sítios de restrição: NcoI na região upstream do gene, e EcoR V na região *downstream* do gene. Desta forma, os *primers* P.FwLc24_645pb e P.RvLc24_645pb foram desenhados (Quadro 3) para amplificação do fragmento de 624pb a partir do DNA genômico de *L. infantum* (Figura 3), posteriormente ligados ao vetor pMAL-p5x linearizado com as mesmas enzimas de restrição.

Figura 3. Amplificação da ORF Lc24. Eletroforese do produto de amplificação da ORF Lc24 (624 pb) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com os *primers* P.FwLc24_645pb e P.RvLc24_645pb, tendo como molde o gDNA de *L. infantum*. Mpb (marcador de pares de base 1 kb Plus Ladder (Invitrogen) e 1, 2, 3 e 4, produto de amplificação de quatro reações independentes.

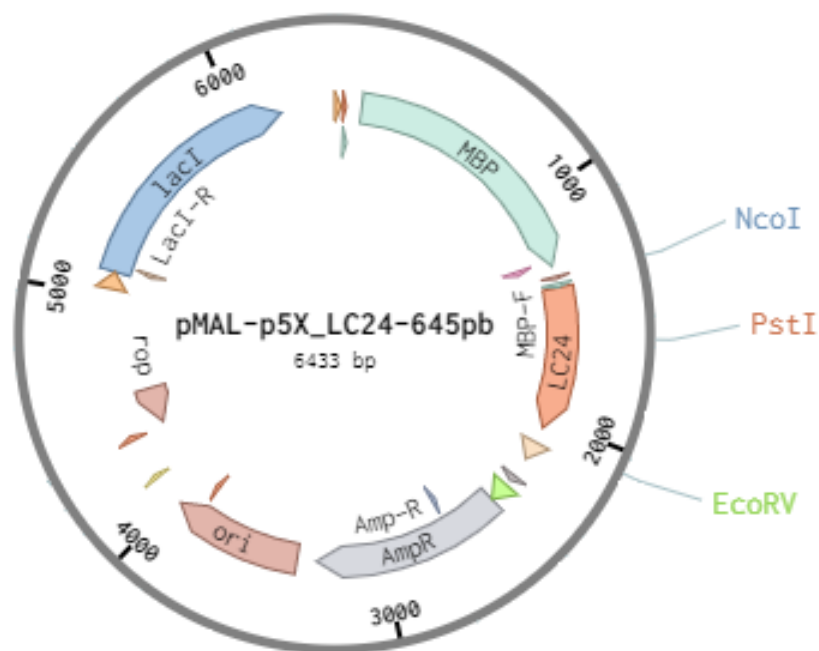


Fonte: Elaborado pelo Autor (2022).

4.4 Ligação do inserto Lc24 no vetor de expressão pMAL_p5X

Visando a expressão da proteína Lc24 com melhor solubilidade em *E. coli*, utilizou-se o vetor pMAL_p5X (Figura 4). Este vetor foi escolhido porque expressa a proteína ligante de maltose (MBP) que, quando fusionada à proteína de interesse, pode aumentar a solubilidade de diferentes proteínas e expressas em diferentes linhagens de *E. coli*, ajudando sua purificação. Desta forma, optou-se em fusionar MBP na região N-terminal da Lc24 e avaliar sua expressão em *E. coli*. O conjunto de MBP e uma cauda de histidina (His-tag) ajuda no melhoramento dessa purificação. His-tag é uma sequência que não causa mudança de carga elétrica da proteína associada, não interfere na migração nem no dobramento correto da proteína, sendo assim, sua função biológica não é alterada após a purificação (CARSON et al., 2007).

Figura 4. pMAL-p5X_Lc24-645pb contendo sítios de restrição NcoI, PstI e EcoRV.

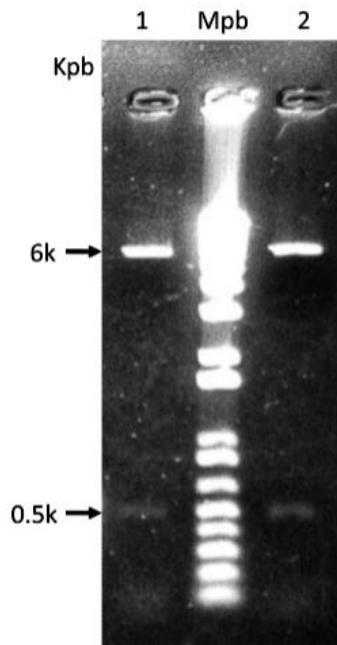


Fonte: Benchling (2022).

O plasmídeo também foi digerido com as enzimas EcoRV e NcoI, assim como o produto da amplificação, seguido de ligação e transformação de *E. coli*.

Colônias ampicilina resistentes foram selecionadas para avaliação do DNA plasmidial (pDNA) após digestão com a enzima PstI para confirmação do clone, gerando dois fragmentos de 6 Kpb e 0,5 Kpb correspondentes ao plasmídeo e inserto, respectivamente (Figura 5).

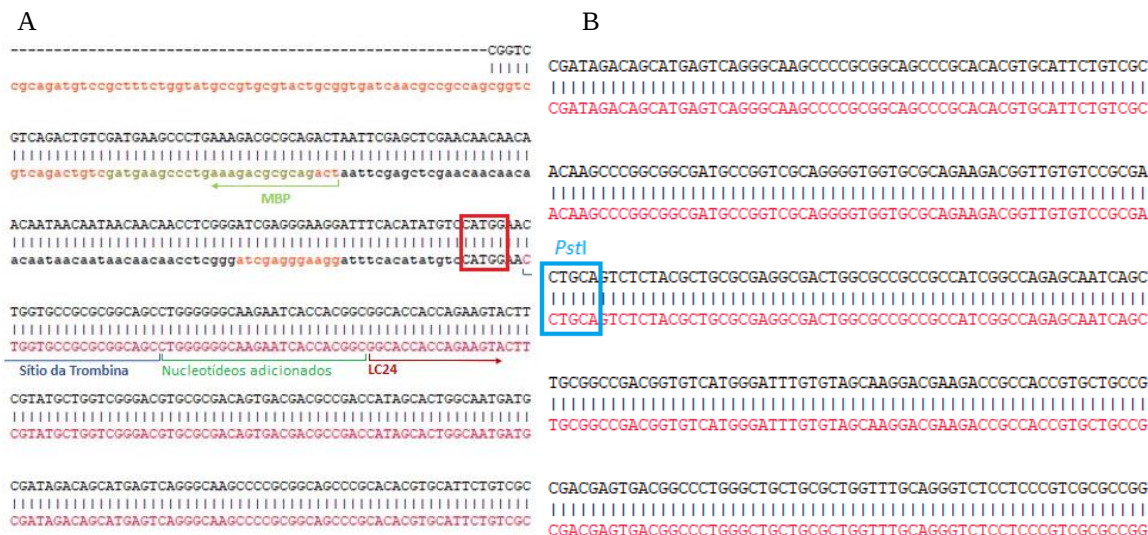
Figura 5 — Eletroforese em gel de agarose para avaliação do plasmídeo recombinante pMAL_p5X_Lc24-645pb via kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (Cellco Biotecnologia®). **Mpb.** Marcador de peso molecular 1kb Plus Ladder (Invitrogen). **1 e 2.** Digestão do pDNA de dois clones bacterianos ampicilina-resistentes com a enzima PstI (New England).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Após esta etapa, foi realizado sequenciamento para confirmação da fase aberta de leitura do fragmento Lc24. A figura 6 mostra o alinhamento entre as sequências obtida e Lc24. Apesar da boa qualidade obtida no alinhamento das sequências, a região *downstream*, onde está localizado o sítio de restrição da enzima NcoI, não foi efetuada, caso comum em sequências longas, o que acaba não deixando nenhuma dúvida sobre a relação de similaridade sobre a fase aberta de leitura. Importante ressaltar, também, que quando os desenhos dos *primers* utilizados foram feitos, a sua estrutura conformacional a partir dos primeiros nucleotídeos codificadores da proteína Lc24 resultam em *primers* com uma estrutura em formato de grampo, sendo assim, impossibilitando o procedimento de PCR. Portanto, foram adicionados mais 24 pb a ORF codificadora da Lc24.

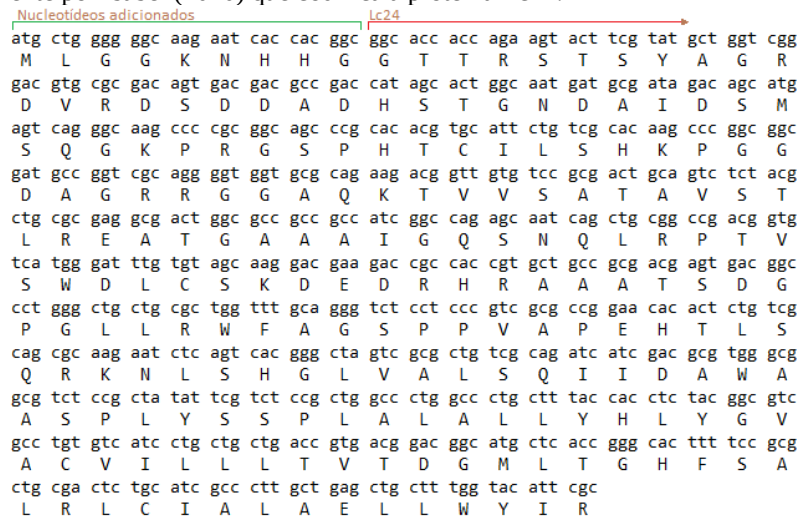
Figura 6. Alinhamento de seqüências do pDNA, feito em equipamento ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, após a clonagem do gene Lc24 de *L. infantum*. O pDNA foi extraído e submetido a PCR com *primers* P.Fw_pMAL-Thrombin-Lc06 e P.Rv_pMAL-Lc06 e o Kit BigDye Terminator v3.1 *Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Neste alinhamento, estão destacadas as regiões: **A.** Região upstream do gene, destaque para o sítio de restrição *EcoRV*. **B.** Destaque para a região onde se localiza o sítio de restrição para *PstI*.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022).

Após o alinhamento das seqüências nucleotídicas, foi analisada também a fase aberta de leitura e seu resultado comparado com os dados já obtidos por Isabel (2010). A figura 7 mostra, em detalhes, a fase aberta de leitura utilizada para codificar a proteína Lc24 e então ser comparada com o alinhamento feito.

Figura 7. Fase aberta de leitura das bases nucleotídicas que codificam a proteína Lc24. Nucleotídeos adicionados. Sequência contendo 24 pb adicionais provenientes da proteína de resistência a múltiplas drogas da qual a ORF Lc24 foi encontrada como um fragmento com boa atividade antigênica. Lc24, fase aberta de leitura encontrada anteriormente por Isabel (2010) que codifica a proteína Lc24.

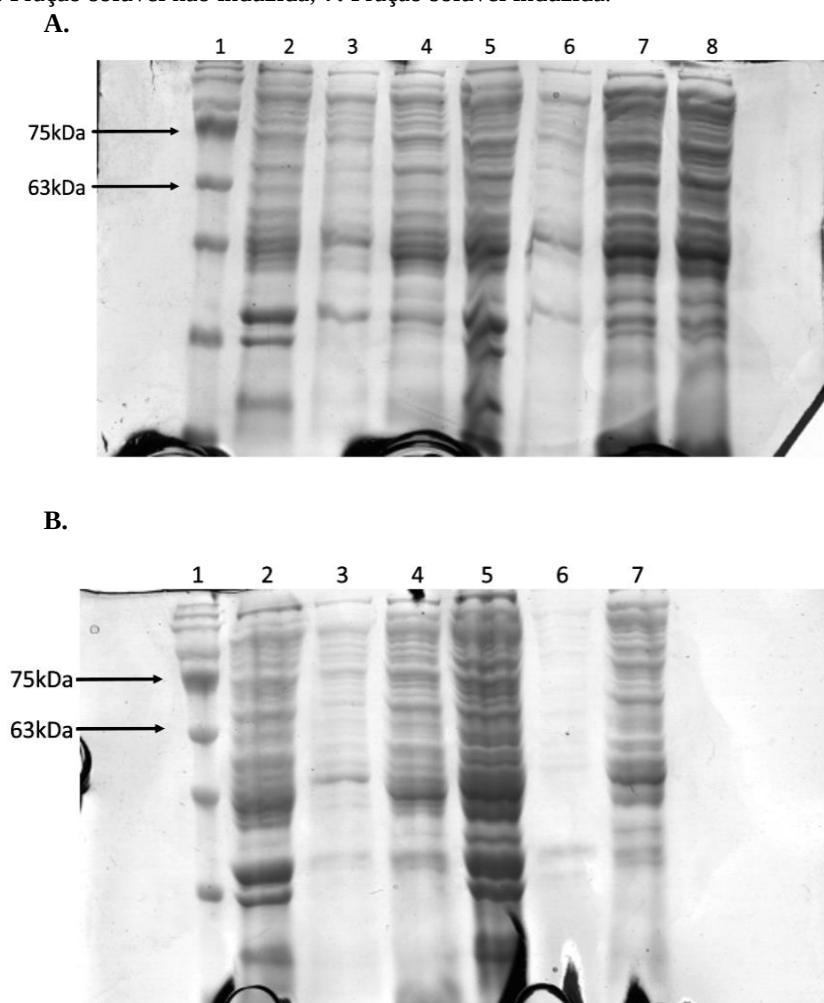


Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

4.5 Indução da expressão da proteína Lc24 em *E. coli*.

Para a expressão do plasmídeo pMAL-p5X_LC24-645pb, as linhagens de *E. coli* Rosetta e BL21 *Codon Plus* foram transformadas. Para isso, após confirmação do sequenciamento, o clone 1 obtido foi selecionado para que o processo de indução da proteína fosse feito. O resultado da indução por IPTG, de 18 h, pode ser avaliado na Figuras 8.a referente a indução em linhagem de *E. coli* Rosetta e 8.b referente a indução em linhagem de BL21 *Codon Plus* por eletroforese em gel SDS-PAGE.

Figura 8 - Análise da indução da expressão de Lc24 (70kDa) em duas diferentes linhagens de *E. coli*. Eletroforese em gel SDS-PAGE após extração das proteínas induzidas em Rosetta (A) e Codon plus (B) a 37°C por 18 h. Em (A): 1. Padrão de peso molecular *BlueEye Prestained Protein Marker* (10-245 kDa); 2. fração insolúvel induzida; 3. Fração solúvel não induzida; 4. Fração solúvel induzida; 5. Fração insolúvel induzida; 6. Fração solúvel não induzida; 7. Fração solúvel induzida. Em (B): 1. Padrão *BlueEye Prestained Protein Marker* (10-245 kDa); 2. Fração insolúvel induzida; 3. Fração solúvel não induzida; 4. Fração solúvel induzida; 5. Fração insolúvel induzida; 6. Fração solúvel não induzida; 7. Fração solúvel induzida.



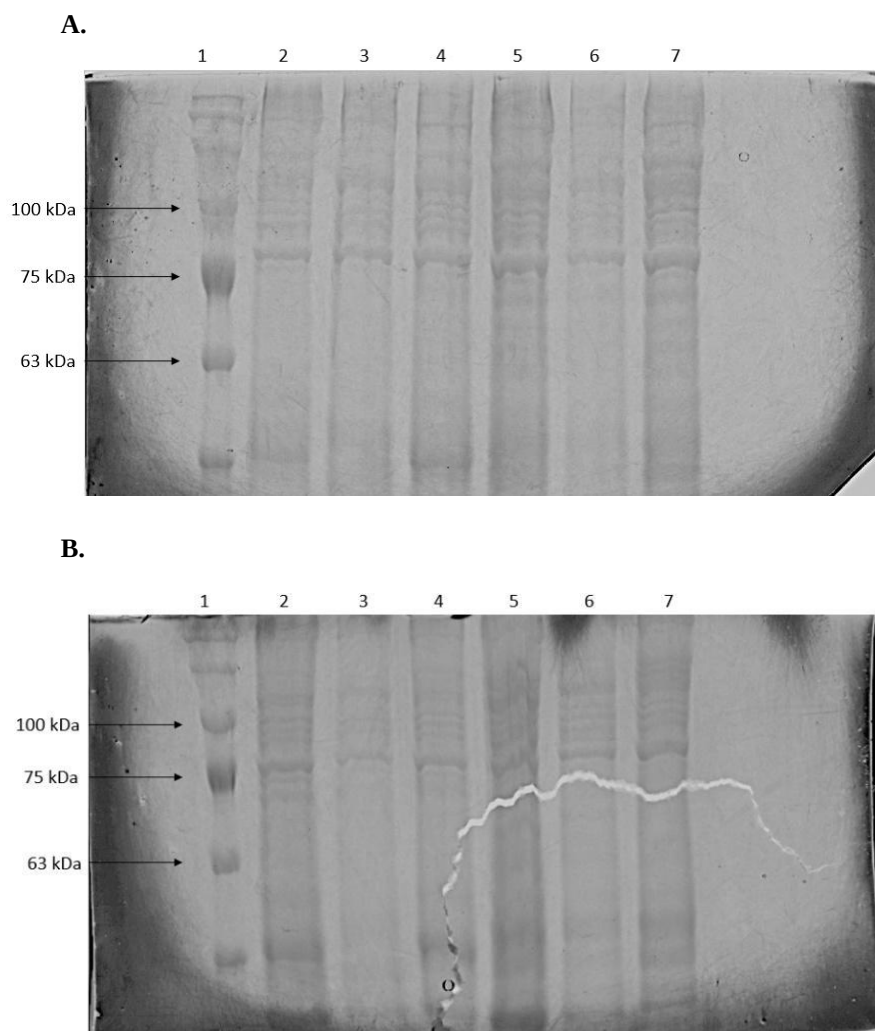
Fonte: Elaborado pelo Autor (2022).

Pode-se observar que não há bandas indicativas da proteína truncada

esperada MBP::Lc24, de massa igual a 70 kDa, após indução com IPTG na região entre 63 e 75 kDa indicada pelo padrão de peso molecular. De acordo com o manual *pMAL Protein Fusion & Purification System*, é possível que a expressão neste vetor tenha sido baixa já que esta ocorre preferencialmente no periplasma, o que pode corresponder a 1-20% das proteínas totais expressas, o que pode estar comprometendo a visualização da banda de interesse no gel SDS-PAGE. Para a confirmação desta não expressão, foram feitos experimentos de Western Blot mas devido a complicações em relação aos reagentes, onde nem a molécula usada como controle positivo, a CPB que é uma protease homóloga à catepsina B e é uma enzima que são predominantemente expressar por formas amastigotas de *Leishmania* (OLIVEIRA, 2010), conseguiu ser revelada após a adição da solução de revelação 1-Step Ultra TMB-Blotting (*Bio Rad*), como também a falta dessa solução de revelação já que o que foi utilizado era cedido gentilmente pelo laboratório de Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia (DBB) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", e levando em consideração o tempo em que esse trabalho deveria ser entregue, o experimento não pôde ser concretizado com êxito.

Foi levado em consideração, após o estudo feito, a possibilidade de talvez a visualização da possível proteína expressada, através da indução, em gel SDS-PAGE ter sido prejudicada levando em consideração a porcentagem do gel (10%), deixando então supostamente a proteína em uma região superior do gel, onde a corrida começa, em um aglomerado de bandas. De acordo com o manual "A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas" (EMBRAPA, 2001), a variação da porcentagem de poliacrilamida acaba permitindo a alteração do tamanho dos poros do gel, portanto, um gel feito com uma porcentagem menor resultaria em poros ligeiramente maiores onde a proteína em estudo teria mais facilidade em passar e então ficando mais visível. O gel feito anteriormente tinha uma porcentagem de 10%, os reagentes utilizados para a confecção deste gel foram todos previamente calculados em servidor *Chang Bioscience – Trys-glycine SDS-Polyacrylamide Gel (SDS-PAGE Calculator)*. Esses géis têm valores de porcentagens tabeladas, e um valor menor que o utilizado previamente é de 7,5%, que nos proporciona a separação de proteínas de tamanhos que variam entre 20-120 kDa. Esse gel foi produzido e o produto da indução da expressão da proteína Lc24 foi novamente avaliada como mostram as figuras 9.a e 9.b, e visto que, novamente, não foi possível visualizar bandas na região de 70 kDa referente a proteína.

Figura 9 — Análise da indução da expressão de Lc24 (70kDa) em duas diferentes linhagens de *E. Coli* em gel SDS-PAGE (7,5%). Eletroforese em gel SDS-PAGE após extração das proteínas induzidas em Rosetta (A) e Codon plus (B) a 37°C por 18 h. Em (A): **1.** Padrão de peso molecular *BlueEye Prestained Protein Marker* (10-245 kDa); **2.** fração insolúvel induzida; **3.** Fração solúvel não induzida; **4.** Fração solúvel induzida; **5.** Fração insolúvel induzida; **6.** Fração solúvel não induzida; **7.** Fração solúvel induzida. Em (B): **1.** Padrão *BlueEye Prestained Protein Marker* (10-245 kDa); **2.** Fração insolúvel induzida; **3.** Fração solúvel não induzida; **4.** Fração solúvel induzida; **5.** Fração insolúvel induzida; **6.** Fração solúvel não induzida; **7.** Fração solúvel induzida.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2022).

4.6 Predição de epítomos

Devido às dificuldades experimentais durante o processo de expressão da proteína Lc24, optou-se por utilizar a síntese química de peptídeos como uma estratégia alternativa. Este processo, embora apresente limitação quanto ao tamanho dos peptídeos que podem ser produzidos, possibilita a não dependência microbiana para expressão protéica, possibilitando, inclusive, a remoção de possíveis contaminações biológicas presentes na formulação vacinal (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016). O uso de epítomos antígenicos mínimos que podem desencadear as respostas imunes desejadas vem sendo explorada no

desenvolvimento de vacinas seguras e à base de peptídeos sintéticos (Skwarczynski and Toth, 2016,). Para identificação das sequências mínimas para síntese, a estratégia de predição de epítomos com capacidade antigênica vem sendo utilizada em vários estudos de desenvolvimento de vacinas para diferentes tipos de doenças (OLIVA et al., 2014; BORJA-CABRERA et al., 2002; LAURINDO, 2021; MARTINS et al 2015; DAKAPPAGARI et al., 2003; HAJIGHAHRAMANI et al., 2017; NYARI et al., 2018). Além de leishmanioses, esta estratégia vem sendo aplicada em desenvolvimento de vacinas contra tumores (DAKAPPAGARI et al., 2003; HAJIGHAHRAMANI et al., 2017) e também no controle da clamidiose (NYARI et al., 2018).

Importante ter o conhecimento de que *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios, infectando células do sistema fagocítico mononuclear, tendo os macrófagos como seu principal alvo. Quando fagocitados, esse parasita consegue modificar a resposta da célula, mudando assim, também, a sua resposta imunológica de Th1 para Th2, o que acaba favorecendo o estabelecimento da infecção e a progressão da doença (GREGORY; OLIVIER, 2005; ROSSI; FASEL, 2018). Desta forma, em uma tentativa de reverter a infecção é necessário que ocorra a ativação do macrófago e uma polarização da resposta do tipo Th1, o que é possível com a produção de IFN- γ (MANTOVANI; SICA; SOZZANI; ALLAVENA et al., 2004). As células B tem uma capacidade interessante de conseguir atuar tanto como uma célula apresentadora de antígeno como também ser capaz de polarizar uma resposta Th1, sendo assim, as células B tornam-se alvos interessantes para a produção de uma vacina para o controle das leishmanioses.

Vários estudos realizados em modelos murinos, como as linhagens BALB/c e Swiss, infectados por *Leishmania*, têm demonstrado o importante papel da resposta imune humoral e celular na defesa contra *Leishmania* (REIS et al., 2006; CORRÊA, 2011; NATALE et al., 2016). Assim, a seleção de sequências peptídicas imunogênicas na proteína Lc24, baseou-se na presença de epítomos de células B, epítomos de células TCD8⁺ e células T CD4⁺, esta última, produtoras de IFN- γ . Adicionalmente essas sequências deveriam ser não tóxicas, não alergênicas e sem similaridades com proteínas de cães. Para alcançar esses objetivos, foram utilizados vários algoritmos *in silico* de livre acesso e usados comumente no desenho de vacinas peptídicas (AGALLOU et al., 2014; AGALLOU et al., 2011; COSTA et al., 2014; MARTINS et al., 2015). O nosso primeiro passo foi identificar epítomos de células B na sequência Lc24, pois como dito anteriormente, as células B fazem reconhecimento de antígenos, levando à produção de células de memória antígeno-específico e diferenciação em plasmócitos que são células responsáveis pela produção e secreção de anticorpos (MINGES-WOLS, 2005; FONTES, 2019).

Neste trabalho, utilizou-se dois algoritmos de predição de epítomos lineares de células B: o BepiPred 2.0 e o ABCpred, onde foram identificados seis epítomos para células B (Quadro 4) e 18 epítomos para células B, respectivamente (Quadro 5), classificados em ordem decrescente quanto à probabilidade de serem verdadeiramente epítomos lineares de células B.

Quadro 4. Epítomos lineares de células B da proteína Lc24 de *L. infantum* predito por BepiPred 2.0.

BepiPred 2.0				
Número	Peptídeo	Comprimento	Início	Fim
1	STSYAGRDVRDSDADHSTGND AIDSMSQGKPRGSPH	37	5	41
2	HKPGGDAGRRGGAQKT	16	46	62
3	EATGAAAIGQSNQLRPTVSWDLCSKDEDRHRAAATSDG PGL	41	74	114
4	WFAGSPPVAPEHTLSQRKNLSH	22	117	138
5	AASPLY	6	151	156
6	MLTG	4	184	187

Fonte: Elaborato pelo autor (2022)

Quadro 5. Epítomos lineares de células B da proteína Lc24 de *L. infantum* predito por ABCpred.

ABCpred			
Rank	Peptídeo	Pontuação	Início
1	KPGGDAGRRGGAQKTV	0,92	48
1	HSTGNAIDSMSQGKP	0,92	21
2	DSMSQGKPRGSPHTCI	0,9	29
3	DLC SKDEDRHRAATS	0,89	94
4	GQSNQLRPTVSWDLCS	0,86	82
4	RSTSYAGRDVRDSDDA	0,86	4
5	HRAAATSDGPGLLRWF	0,84	103
6	GRDVRDSDADHSTGN	0,83	10
7	TCILSHKPGGDAGRRG	0,82	42
8	IDAWASPLYSSPLAL	0,81	147
9	PVAPEHTLSQRKNLSH	0,8	123
10	VDGMLTGHFSALRLC	0,77	180
11	LLRWFAGSPPVAPEHT	0,76	114
12	STREATGAAIGQSN	0,75	70
13	HGLVALSQIIDAWAAS	0,74	138
14	TL SQRKNLSHGLVALS	0,68	129
15	GGAQKTVVSATAVSTL	0,66	57
16	SPLALLYHLYGVAC	0,58	158
17	TGHFSALRLCIAEL	0,54	186
18	ACVILLTVTDGMTG	0,53	172

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Adotou-se o critério de seleção de sequências sobrepostas ou compartilhadas entre os servidores Bepipred e ABCpred, ou seja, priorizou-se aquelas sequências que aparecem nos dois servidores simultaneamente e que estariam compartilhando uma parte ou toda a sequência de resíduos de aminoácidos, como potenciais epítomos lineares de células B (Quadro 6). Este estilo de filtragem de epítomos de células B já rendeu resultados satisfatórios em estudos de imunogenicidade de candidatos vacinais peptídicos, como aquele descrito por Vahedi et al. (2022), que utilizou os servidores ABCpred e BepiPred 2.0 como filtros iniciais.

Quadro 6. Epítomos lineares de células B preditos pelos programas BepiPred 2.0 e ABCpred com destaque para as regiões sobrepostas. Apenas os epítomos que apresentam sobreposição maior ou igual a 50% contendo de 10-20 resíduos de aminoácidos foram selecionados e identificados em negrito.

Servidor	Epítopo
BepiPred-2.0	GTTR STSYAGRDVRDSDDADHSTGND DAIDSM SQGKPRGSPH TCILS
ABCpred	GTTRSTSYAGRDVRDSDDAD HSTGND DAIDSM SQGKPRGSPH TCILS
	GTTRSTSYAGRDVRDSDDADHSTGND AI DSMSQGKPRGSPH TCILS
	GTT RSTSYAGRDVRDSDDA DHSTGND AI DAIDSM SQGKPRGSPH TCILS
	GTTRSTSYA GRDVRDSDDADHSTGN DAIDSM SQGKPRGSPH TCILS
BepiPred-2.0	TCILS HKPGGDAGRRGGAQKT VVSATAVSTLR
=ABCpred	TCILSH KPGGDAGRRGGAQKT VVSATAVSTLR
	TCILSHKPGGDAGRRGGAQKT VVSATAVSTLR
	TCILSHKPGGDAGRR GGAQKT VVSATAVSTLR
BepiPred-2.0	STLRE ATGAAAIGQSNQLRPTVSWDLCSKDEDRHRAAATSDGPGL LRWFAGSPPVAPEHT
ABCpred	STLRE ATGAAAIGQSNQLRPTVSWDLCSKDEDRHRAAATSDGPGL LRWFAGSPPVAPEHT
	STLRE ATGAAAIGQSNQLRPTVSWDLCSKDEDRHRAAATSDGPGL LRWFAGSPPVAPEHT
	STLRE ATGAAAIGQSNQLRPTVSWDLCSKDEDRHRAAATSDGPGL LRWFAGSPPVAPEHT
	STLRE ATGAAAIGQSNQLRPTVSWDLCSKDEDRHRAAATSDGPGL LRWFAGSPPVAPEHT
	STLRE ATGAAAIGQSNQLRPTVSWDLCSKDEDRHRAAATSDGPGL LRWFAGSPPVAPEHT
BepiPred-2.0	LLR WFAGSPPVAPEHTLSQRKNLSH GLVALSQIIDAWAASPLYSSPLAL
ABCpred	LLRWFAGSPPVAPEHTLSQRKNLSH GLVALSQIIDAWAASPLYSSPLAL
	LLRWFAGSP PVAPEHTLSQRKNLSH GLVALSQIIDAWAASPLYSSPLAL
	LLRWFAGSPPVAPEHTLSQRKNLS HGLVALSQIIDAWAAS PLYSSPLAL
	LLRWFAGSPPVAPEH LSQRKNLSHGLVALS QIIDAWAASPLYSSPLAL
BepiPred-2.0	TLSQRKNLSHGLVALSQIIDAW AASPLY SSPLALALLYHLYGVAC
ABCpred	TLSQRKNLSHGLVALSQI DAWAASPLYSSPLAL ALLYHLYGVAC
	TLSQRKNLS HGLVALSQIIDAWAAS PLYSSPLALALLYHLYGVAC
BepiPred-2.0	SPLALALLYHLYGVACVILLLLTVTDG MLTGHFSALRLCIAEL
ABCpred	SPLALALLYHLYGVACVILLLLTVTDG MLTGHFSALRLCIAEL
	SPLALALLYHLYGVACVILLLLTVTDG MLTGHFSALRLCIAEL
	SPLALALLYHLYGVACVILLLLTVTDG MLTGHFSALRLCIAEL

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Das 20 sequências obtidas pelo servidor ABCpred (Quadro 5), 17 foram priorizadas de acordo com as sobreposições, tendo como corte o número mínimo de oito resíduos (Quadro 6). Quatro das sequências identificadas pelo servidor BepiPred, de 37 (STSYAGRDVRDSDDADHSTGND**AI**DAIDSM**SQGKPRGSPH**), 41 aminoácidos (EATGAAAIGQSNQLRPTVSWDLCSKDEDRHRAAATSDGPG), cinco (AASPLY) e de

quatro aminoácidos (MLTG) não foram consideradas para síntese, devido ao tamanho. Apenas 17 sequências sobrepostas entre os servidores ABCpred e Bepipred (Quadro 6) foram escolhidas, já que do ponto de vista imunológico, considerando que os peptídeos precisam ter um tamanho apropriado entre oito e 30 aminoácidos para se ajustarem à fenda de reconhecimento de células T (MHC-I reconhece epítomos com tamanho entre oito a 11 aminoácidos e MHC-II, epítomos com tamanho entre 11 a 30 de aminoácidos) (SILVA, 2011; SILVA, 2021), as sequências supracitadas não foram consideradas para síntese.

Resumidamente, temos que o sistema imunológico combate os agentes infecciosos através de fatores solúveis, como por exemplo os anticorpos produzidos pelos linfócitos B; no entanto, é muito importante, também, considerar nesta abordagem de imunoinformática para o desenvolvimento de uma vacina, a propriedade de que os peptídeos selecionados induzam outros mecanismos imunológicos como resposta imune expressa pelos linfócitos T ($CD8^+$) e T auxiliares ($CD4^+$), ativados por moléculas apresentadoras de antígenos MHC-I e MHC-II. Os linfócitos T $CD8^+$, referentes a moléculas de MHC I, ligam-se a peptídeos de proteínas intracelulares após degradação pelo proteossoma e serve como mecanismo de controle para variações antigênicas, podendo contribuir para a indução da lise de células infectadas, com a produção de células *natural killer* (NK), facilitando a eliminação do agente invasor. Já as células T $CD4^+$, referentes a moléculas de MHC de classe II, ligam-se a peptídeos gerados pela digestão de proteínas extracelulares e, também, ajudam outras células envolvidas na resposta imunitária, fagocitose, citotoxicidade e produção de anticorpos, como as de linfócitos B, contribuindo então para a estimulação e especialização funcional dessas células. Com isso, ambos os sistemas MHC podem exercer controle sobre organismos estranhos por meio da apresentação de proteínas não próprias às células T (Dieffenbach and Fauci, 2020; REYNISSON; ÁLVAREZ; PAULO; PETERS; NIELSEN, 2020). Portanto, é de suma importância que o epítipo escolhido tenha, como uma forma de melhoramento na potencialização dessa resposta imune, um reconhecimento por células do tipo MHC de classe I e II para que então sejam apresentadas para os linfócitos T.

Para que fosse estudado, então, se os epítomos escolhidos possuíam capacidade de serem reconhecidos pelas células MHC-I e MHC-II, as sequências de resíduos de aminoácidos foram submetidas ao servidor de reconhecimento de células T, o EpiDOCK Server. Esse servidor prevê a ligação de 23 alelos humanos MHC classe II mais frequentes, 12 alelos HLA DR, seis de HLA-DQ e cinco alelos HLA DP. O MHC classe II apresenta os peptídeos derivados de proteínas extracelulares endocitadas e é codificado por três loci, HLA DR, HLA DQ e HLA DP. A fenda de ligação das proteínas do MHC Classe II são abertas e permitem a ligação de peptídeos mais longos (UNNI et al., 2019). Esses alelos cobrem mais de

95% da população humana (ATANASOVA et al., 2013). O EpiDOCK converte a sequência de entrada em uma coleção de sequências em *tandem* e sobrepostas (*nonamer*), a partir de um núcleo peptídico de nove resíduos contíguos. Cada *nonamer* é avaliado por uma matriz quantitativa baseada em pontuação de encaixe (DS-QM) derivada para a proteína HLA classe II selecionada e atribuída uma pontuação. É dado um limiar para a ligação a cada proteína HLA. Peptídeos com pontuações maiores ou iguais ao limite dado são previstos como ligantes, caso contrário, não são ligantes (ATANASOVA, 2013). Os resultados obtidos pelo servidor EpiDOCK, aqui apresentados em Anexo nos Quadros 12-28, mostraram que os peptídeos escolhidos obtiveram resultados positivos em alelos de HLA deixando claro que estes peptídeos em estudo têm características de ser ligante de células B e T, já que a suas pontuações foram maiores ou iguais que as especificadas pelo próprio servidor referente a cada alelo de HLA analisada.

Para a verificação de reconhecimento de moléculas de MHC de classe I, o servidor NetMHCpan 4.1 foi utilizado (Quadro 7). Este servidor classifica os ligantes dessas moléculas como ligantes fortes (SB – *Strong Binder*) e ligantes fracos (WB- *Weak Binder*). O NetMHCpan 4.0 é um método que explora estratégias personalizadas de aprendizado de máquina para integrar diferentes tipos de dados de treinamento, resultando em desempenho de última geração e superando seus concorrentes. O conjunto de dados combinados usado para treinamento de NetMHCpan 4.1 consiste em 13.245.212 de peptídeos cobrindo 250 moléculas MHC classe I distintas, e o conjunto de dados combinado usado para treinamento de NetMHCIIpan 4.0 (REYNISSON; ÁLVAREZ; PAULO; PETERS; NIELSEN, 2020).

Quadro 7. Análise de epítomos sobrepostos selecionados anteriormente em relação ao reconhecimento de moléculas MHC I utilizando o servidor NetMHCpan 4.1. *Peptídeos*. Peptídeos sobrepostos. ***Reconhecimento*.** Epítomos selecionados como positivos (+) caso tenham algum reconhecimento da moléculas de MHC I ou negativos (-) caso não tenham reconhecimento. ***Classificação*.** concedida como WB (ligante fraco) e SB (ligante forte). ***Alelo(s)*.** Alelos reconhecidos pelos peptídeos caso o reconhecimento seja positivo.

Peptídeos	NetMHCpan	Classificação	Alelo (s)
HSTGND AIDSMSQGKP	+	WB	H2-Db
DSMSQGKPRGSPHTCI	-	-	-
RSTSYAGR DVRSDDA	-	-	-
GRDVRSDDADHSTGN	-	-	-
HKPGGDAGRRGGAQKT	-	-	-
KPGGDAGRRGGAQKTV	-	-	-
TCILSHKPGGDAGRRG	-	-	-
GGAQKTVVSATAVSTL	+	WB WB WB SB WB	H1-Kb H2-Kd H2-Db H2-Dd H2-Ld
DLCSKDEDRHRAAATS	-	-	-
GQSNQLRPTVSWDLCS	+	WB WB	H2-Dd H2-Ld
HRAAATSDGPGLLRWF	+	SB	H2-Dd
STLREATGAAAIGQSN	+	SB	H2-Dd
LLRWFAGSPPVAPEHT	+	SB	H1-Kd
PVAPEHTLSQRKNLSH	-	-	-
IDAWAASPLYSSPLAL	+	SB SB SB	H2-Kb H2-Db H2-Dd
VTDGMLTGHFSALRLC	+	WB WB	H2-Kb H2-Dd
CVILLT VTDGMLTG	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Além da seleção de peptídeos nos servidores especializados supracitados, é de suma importância em um estudo de predição, considerar outras características, como descrito a seguir. Para que ocorra eficiente conectividade entre os diferentes tipos celulares que compõem o sistema imunológico, são produzidas citocinas que modulam a resposta imune pela estimulação de receptores presentes na superfície das células, como a indução de produção de moléculas como IFN γ e de citocinas como IL-4 e IL-10. As citocinas podem ser produzidas por células T CD4⁺ e, de acordo com o padrão de citocinas secretadas, estas células T CD4⁺ podem ser classificadas em duas sub-populações denominadas Th1 e Th2. A primeira sub-população produz IL-2 e IFN- γ , responsáveis pelo direcionamento da resposta imunológica mediada por

células. Já a subpopulação Th2 produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que ativam a resposta imune humoral, de tal maneira que a síntese defeituosa de citocinas pode contribuir para o surgimento e manutenção da hipogamaglobulinemia (ERRANTE e CONDINO-NETO, 2008). Portanto, procurando uma indução da produção de IFN- γ referente a resposta Th1 o servidor IFNEpitope foi utilizado. A citocina IFN- γ potencializa a atividade dos macrófagos, produzindo mais espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e outras moléculas que contribuem com a morte do patógeno fagocitados pelos macrófagos (CONCEIÇÃO-SILVA e ALVES, 2014). Levando em consideração o que foi dito anteriormente, é possível que as sequências sobrepostas preditas (Quadro 6) contenham motivos de IFN- γ , o que podem ativar linfócitos T CD4⁺ que são indutoras dessa citocina e conseqüentemente acaba contribuindo na defesa imune contra a *Leishmania*. Os resultados obtidos no IFNEpitope estão demonstrados no Quadro 8.

Quadro 8. Análise de indução na produção da citocina IFN- γ . Classificados como positivos (+) os peptídeos que induzem as moléculas, e classificados como negativos (-) os que não induzem.

Peptídeo	IFN- γ
HSTGNDAIDSMSQGKP	-
DSMSQGKPRGSPHTCI	-
RSTSYAGRDVRDSDDA	+
GRDVRDSDDADHSTGN	+
HKPGGDAGRRGGAQKT	+
KPGGDAGRRGGAQKTV	+
TCILSHKPGGDAGRRG	+
GGAQKTVVSATAVSTL	-
DLCSKDEDRHRAAATS	+
GQSNQLRPTVSWDLCS	+
HRAAATSDGPGLLRWF	-
STLREATGAAAIGQSN	-
LLRWFAGSPPVAPEHT	-
PVAPEHTLSQRKNLSH	+
IDAWAASPLYSSPLAL	+
VTDGMLTGHFSALRLC	+
CVILLTVDGMLTG	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A toxicidade, ou alergenicidade e a similaridade com sequências caninas, são outros parâmetros importantes de seleção para a aplicação vacinal pretendida (Quadro 10). O servidor ToxinPred foi utilizado, então, para que fosse visto se o peptídeo escolhido apresentaria algum tipo de toxicidade em um eventual ensaio de imunização. Como resultado, o servidor mostrou que o peptídeo não é tóxico. Utilizando o servidor AllerTOP v. 2.0 foi visto que a probabilidade deste peptídeo ser alergênico é nula. O servidor PIR (*Protein Information Resource*) foi utilizado para verificar, por método de homologia cruzada, se a sequência de

resíduos de aminoácidos do peptídeo já estaria em alguma sequência presente em cães, caso a resposta fosse positiva, o peptídeo escolhido não teria utilidade pois já seria algo de conhecimento do sistema imunológico desses animais, ou seja, não seria um antígeno. O servidor mostrou uma resposta negativa, confirmando então que a sequência poderia ser utilizada como um imunizante.

Quadro 10. Propriedades de probabilidade de antigenicidade, toxicidade, alergenicidade e similaridade com genoma canino dos peptídeos sobrepostos previamente descritos (Quadro 6) da proteína Lc24 preditos anteriormente. Resultados positivos apresentados em verde e resultados negativos apresentados em vermelho.

Peptídeo	Vaxijen 2.0	ToxiPred	AllerTOP v 2.0	PIR
HSTGND AIDSMSGKP	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
DSMSGKPRGSPHTCI	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
RSTSYAGRDVRDSDDA	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
GRDVRDSDADHSTGN	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
HKPGGDAGRRGGAQKT	Antígeno	Não tóxico	Não Alergênico	Sem similaridade
KPGGDAGRRGGAQKTV	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
TCILSHKPGGDAGRRG	Antígeno	Não tóxico	Não Alergênico	Sem similaridade
GGAQKTVVSATAVSTL	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
DLCSKDEDRHRAAATS	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
GQSNQLRPTVSWDLCS	Não antígeno	Não tóxico	Não Alergênico	Sem similaridade
HRAAATSDGPGLLRWF	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
STLREATGAAIGQSN	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
LLRWFAGSPVVAPEHT	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
PVVAPEHTLSQRKNLSH	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
IDAWAASPLYSSPLAL	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
VTDGMLTGHFSA RLRC	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade
CVILLTVTDGMLTG	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	Sem similaridade

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

As características físico-químicas do peptídeo escolhido foram avaliadas em servidor *Peptide Property Calculator (Innovagen)* e no servidor Expasy, onde foi visto que este peptídeo apresentava uma boa solubilidade em água, facilitando então a sua síntese química e posteriormente no manuseio experimental deste peptídeo. Mostrando também seu peso molecular, seu ponto isoelétrico (PI), muito importante para a determinação da carga do lipossoma a ser utilizado, o tempo de meia vida para identificarmos a durabilidade desses peptídeos frente a moléculas que promovem a sua lise e a estabilidade. Todos esses resultados foram analisados e podem ser observados no Quadro 9.

Quadro 9. Resultados referentes às características físico-químicas dos peptídeos preditos e sobrepostos analisados em servidor Expsy (Peso molecular, Ponto isoeletrico, Meia-vida (Hr) e Estabilidade) e em servidor *Peptide Property Calculator (Innovagen)* (Solubilidade). Os resultados de Estabilidade e Solubilidade foram apresentados da seguinte maneira: resultados positivos (estável para Estabilidade e solúvel para Solubilidade) foram apresentados em verde; resultados negativos (instável para Estabilidade e insolúvel para Solubilidade) foram apresentados em vermelho.

Peptídeo	Peso molecular	Ponto Isoeletrico	Meia-vida (h)	Estabilidade	Solubilidade
HSTGNDAIDSMSQGKP	1644,73	5,21	3,5	instável	Solúvel
DSMSQGKPRGSPHTCI	1700,9	8,23	1,1	instável	Solúvel
RSTSYAGRDVRDSDDA	1770,79	4,58	1	instável	Solúvel
GRDVRDSDDADHSTGN	1716,65	4,28	30	estável	Solúvel
HKPGGDAGRRGGAQKT	1592,74	11	3,5	instável	Solúvel
KPGGDAGRRGGAQKTV	1554,73	11	1,3	instável	Solúvel
TCILSHKPGGDAGRRG	1624,84	9,5	7,2	instável	Solúvel
GGAQKTVVSATAVSTL	1489,69	8,75	30	estável	Insolúvel
DLCSKDEDRHRAAATS	1774,88	5,43	1,1	estável	Solúvel
GQSNQLRPTVSWDLCS	1790,97	5,83	30	instável	Insolúvel
HRAAATSDGPGLLRWF	1754,97	961	3,5	instável	Insolúvel
STLREATGAAAIGQSN	1546,66	5,72	1,9	estável	Solúvel
LLRWFAGSPVVAPEHT	1778,04	6,75	5,5	instável	Insolúvel
PVAPEHTLSQRKNLSH	1814,03	9,18	20	instável	Solúvel
IDAWAASPLYSSPLAL	1674,91	3,8	20	instável	Insolúvel
VTDGMLTGHFSAALRLC	1721,02	6,71	100	estável	Insolúvel
CVILLTVDGMLTG	1548,92	3,8	1,2	estável	Insolúvel

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Após todas essas análises, foi elaborado um quadro resumindo todos os resultados obtidos em cada uma das etapas da predição destes epítomos para que então fosse selecionado o mais qualificado para a síntese química. O Quadro 11 nos mostra esses resultados.

Quadro 11. Resumo de resultados obtidos em servidores **EpiDOCK** para epítomos ligantes de MHC de classe II; **NetMHCpan** para epítomos ligantes de MHC de classe I; **IFNEpitope** para reconhecimento de epítomos estimuladores da citocina IFN- γ ; **Vaxijen 2.0** para avaliar se os peptídeos preditos têm a capacidade de ser um antígeno ou não; **ToxinPred** para avaliar o grau de toxicidade dos peptídeos previamente preditos; **AllerTOP 2.0** onde é avaliado a alergenicidade dos peptídeos preditos; **PIR (Protein Information Resource)** para avaliar se por homologia cruzada os peptídeos escolhidos tem alguma homologia com o genoma de cães; Estabilidade e Solubilidade avaliada em servidores **Pepcalc (Peptide Property Calculator)** e **Expasy**.

Peptídeos sobrepostos	EpiDOCK ^a	NetMHCpan ^b	IFN- γ ^c	Vaxijen 2.0 ^d	ToxiPred ^e	AllerTOP 2.0 ^f	PIR ^g	Estabilidade ^h	Solubilidade ⁱ
HSTGND AIDSMSQGKP	+	+	-	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	instável	Solúvel
DSMSQGKPRGSPHTCI	+	-	-	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	instável	Solúvel
RSTSYAGRDVRDSDDA	+	-	+	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	instável	Solúvel
GRDVRDSDADHSTGN	+	-	+	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	estável	Solúvel
HKPGGDAGRRGGAQKT	+	-	+	Antígeno	Não tóxico	Não Alergênico	+	instável	Solúvel
KPGGDAGRRGGAQKTV	+	-	+	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	instável	Solúvel
TCILSHKPGGDAGRRG	+	-	+	Antígeno	Não tóxico	Não Alergênico	+	instável	Solúvel
GGAQKTVVSATAVSTL	+	+	-	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	estável	Insolúvel
DLCSKDEDRHRAAATS	+	-	+	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	estável	Solúvel
GQSNQLRPTVSWDLCS	+	+	+	Não antígeno	Não tóxico	Não Alergênico	+	instável	Insolúvel
HRAAATSDGPGLLRWF	+	+	-	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	instável	Insolúvel
STLREATGAAAIGQSN	+	+	-	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	estável	Solúvel
LLRWFAGSPPVAPEHT	+	+	-	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	instável	Insolúvel
PVAPEHTLSQRKNLSH	+	-	+	Não antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	instável	Solúvel
IDAWAASPLYSSPLAL	+	+	+	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	instável	Insolúvel
VTDGMLTGHFSALRLC	+	+	+	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	estável	Insolúvel
CVILLTVDGMLTG	+	-	-	Antígeno	Não tóxico	Alergênico	+	estável	Insolúvel

^a Critério de classificação: (+) para epítomos que reconhecem 1 ou mais alelos referentes a ligantes de MHC de classe II e (-) para epítomos que não reconhecem; ^b Critério de classificação: (+) para epítomos que reconhecem 1 ou mais alelos referentes a ligantes de MHC de classe I e (-) para epítomos que não reconhecem; ^c Critério de classificação: (+) para epítomos que induzem a expressão da citocina IFN- γ e (-) para epítomos que não reconhecem; ^d Critério de classificação: (Antígeno) para peptídeos com potencial para serem antígenos e (Não antígeno) para os sem potencial; ^e Critério de classificação: (Tóxico) para peptídeos com características de toxicidade e (Não tóxico) para os sem características; ^f Critério de classificação: (Não alergênico) para os peptídeos sem características de alergenicidade e (Alergênico) para os com características de alergenicidade; ^g Critério de classificação: (+) para peptídeos sem homologia com o genoma de cães e (-) para peptídeos com homologia; ^h Critério de classificação: (Estável) para peptídeos estáveis e (Instável) para peptídeos instáveis; ⁱ Critério de classificação: (Solúvel) para peptídeos com alta solubilidade em água e (Não solúvel) para peptídeos com baixa solubilidade em água. Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Como pode ser observado no Quadro 11, nenhum dos peptídeos sobrepostos selecionados atenderam todos os critérios de análises. Isto posto, diminuiu-se a estridência da busca, priorizando o servidor Vaxijen 2.0, para que o candidato a epítopo apresente características de antigenicidade. Como nenhum dos peptídeos foram classificados como citotóxicos, no entanto, apenas os peptídeos HKPGGDAGRRGGAQKT e TCILSHKPGGDAGRRG foram selecionados por não serem potenciais alérgenos.

Os peptídeos HKPGGDAGRRGGAQKT e TCILSHKPGGDAGRRG, de acordo com o Quadro 11, apresentam em comum todas as características em análise, reconhecem moléculas de MHC-II, mas não MHCI, tem a capacidade de promover uma resposta para induzir a produção de IFN γ , são prováveis antígenos de acordo com o servidor Vaxijen 2.0, não possuem características de toxicidade, não são alérgenos, não possuem similaridade com sequências caninas e possuem uma solubilidade desejada para posterior síntese. Para prosseguimento do estudo, e considerando a limitação de tempo inerente a um projeto de mestrado, foi escolhido o peptídeo HKPGGDAGRRGGAQKT, agora denominado GD2102, para síntese, escolha não impeditiva de futuros testes com o peptídeo TCILSHKPGGDAGRRG.

4.7 Desenho e síntese do imunógeno peptídico

Buscando potencializar ainda mais essa resposta imune, foi estudado maneiras de aprimorar a utilização deste peptídeo em uma vacina. O uso de adjuvantes sintéticos é uma abordagem segura e considerado um avanço em relação aos métodos tradicionais de vacinação (NASCIMENTO et al., 2019). Portanto, baseado em estudos de peptídeos sintéticos com características de adjuvante, a ideia foi adicionar ao N-terminal da sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo GD2102, uma sequência adicional de sete resíduos referentes a um peptídeo adjuvante denominado RS09, que é um agonista sintético do receptor 4 do tipo *Toll*, e está envolvido na ativação da resposta imune inata adaptativa (MOYLE and TOTH, 2013; GRUPTA; REGAR et al., 2020;). Os receptores do tipo *Toll* estão envolvidos na ativação da imunidade inata e melhoram a apresentação de antígenos pelas APCs. Este peptídeo adjuvante mimetiza LPS, que se liga ao TLR4 e induz a localização nuclear do fator de transcrição NF-kB, resultando na transcrição de citocinas inflamatórias e secreção de quimiocinas. O envolvimento de RS09 (APPHALS) permite que epítomos que reconheçam os linfócitos citotóxicos T CD8⁺ (CTL) sejam co-estimulados, resultando em uma ativação imune mais robusta. O RS09 se mostrou um peptídeo com capacidade de ser adjuvante excelente e foi utilizado em vários estudos anteriores (JOSHI et al., 2021. REHMAN et al., 2021. KIM et al.,

2020). Após a escolha do peptídeo adjuvante, a junção desses dois fragmentos foi separada por dois espaçadores, no caso a Arginina.

A sequência do peptídeo adicionada de RS09 (**APPHALSRRHKPGGDAGRRGGAQKT**), foi submetida às mesmas análises computacionais supracitadas para verificar se não houve nenhuma modificação em questões de toxicidade, alergenicidade, etc. e potencial antigênica do peptídeo, o que nos proporcionou resultados igualmente positivos. Posteriormente, utilizando um novo servidor, o Expasy, foi visto que o tempo de meia vida deste peptídeo era de aproximadamente 4 h. Para melhorar a meia vida deste peptídeo adicionou-se Valina na posição N-terminal, já que aminoácidos *b-branched* alteram a hidrofobicidade e estabilidade de proteínas (ZUH et al., 1992), o que levou a um ganho de estabilidade predita de 4 h para 100 h. Sendo assim, o desenho de imunógeno peptídico (Figura 1) é intitulado como GD2202.

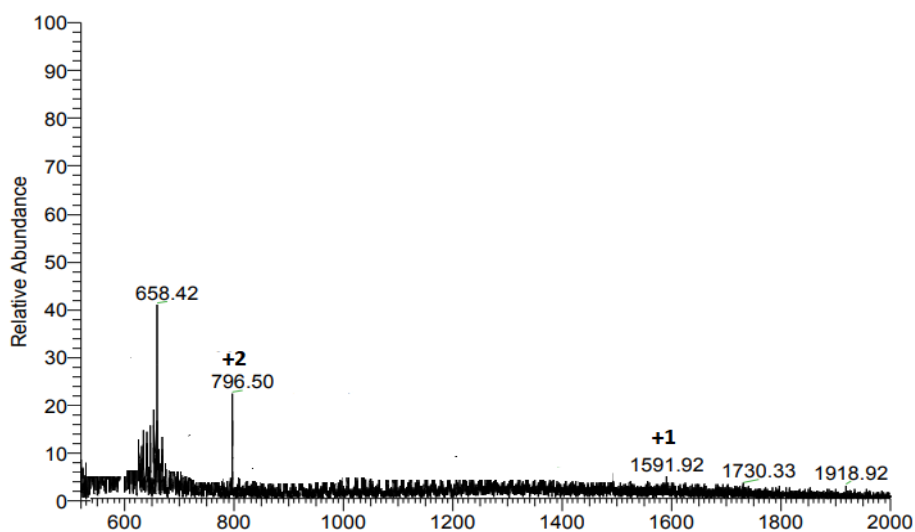
4.8 Síntese em fase sólida dos peptídeos GD2102 e GD2202

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; LIRA; PROTI; REMUZGO et al., 2014). Desta forma, considerando que peptídeos sintéticos de 15 até 30 resíduos podem ser produzidos com graus de pureza satisfatórios foi de suma importância ter encontrado um epítipo com apenas 16 resíduos de aminoácidos que, levando em consideração todos os testes feitos em servidores já apresentados, mostrou uma resposta teoricamente excelente. Estudos de vacinas formuladas com peptídeos já vem sendo feitos tendo como objetivo a prevenção da LVC (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).

Portanto, após a predição, o peptídeo GD2202 foi escolhido para a síntese química. Primeiramente a sequência (GD2101) de 16 resíduos de aminoácidos (HKPGGDAGRRGGAQKT) foi sintetizada em sintetizador Tribute-UV (Protein Technologies) em resina Rink Amida tendo o N,N-metilformamida como agente acoplante e HBTU como o agente desacoplante. Para o acoplamento da sequência restante do peptídeo (GD2202) foi submetido a síntese em fase sólida, partindo de uma massa inicial de 614,68 mg de resina *Rink Amide*. Ao final da síntese obteve-se 1,4835 g de peptidil-resina tendo um ganho então de 869,12 mg para o peptídeo GD2202.

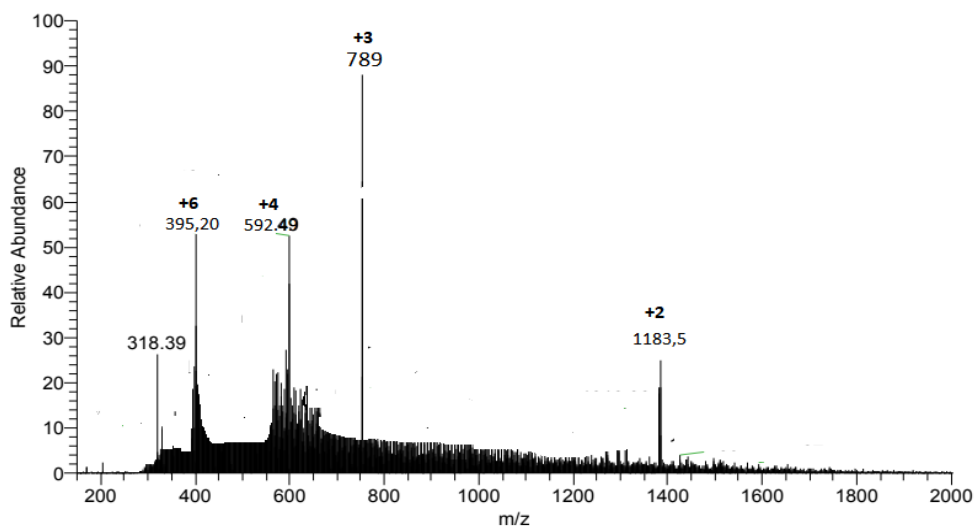
Posteriormente à síntese, as peptídeo-resinas foram clivadas e o material bruto foi separado da resina por solubilização em H₂O e acetonitrila. Após a liofilização, procedeu-se a análise por espectrometria de massas para a confirmação da síntese (Figuras 10 e 11).

Figura 10. Espectro de massas referente ao peptídeo GD2102. Confirmação do material obtido por espectrometria de massas em aparelho *Bruker* injeção *ion trap*, modo *eletrospray* positivo. Sequência do peptídeo: HKPGGDAGRRGGAQKT-NH₂ e massa molar de 1592,74 g.mol⁻¹



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 11. Espectro de massas referente ao peptídeo GD2202. Confirmação do material obtido por espectrometria de massas em aparelho *Bruker* injeção *ion trap*, modo *eletrospray* positivo, utilizando a resolução de massa/carga. Sequência do peptídeo: VAPPHALSRRHKPGGDAGRRGGAQKT-NH₂ e massa molar de 2365,61 g.mol⁻¹

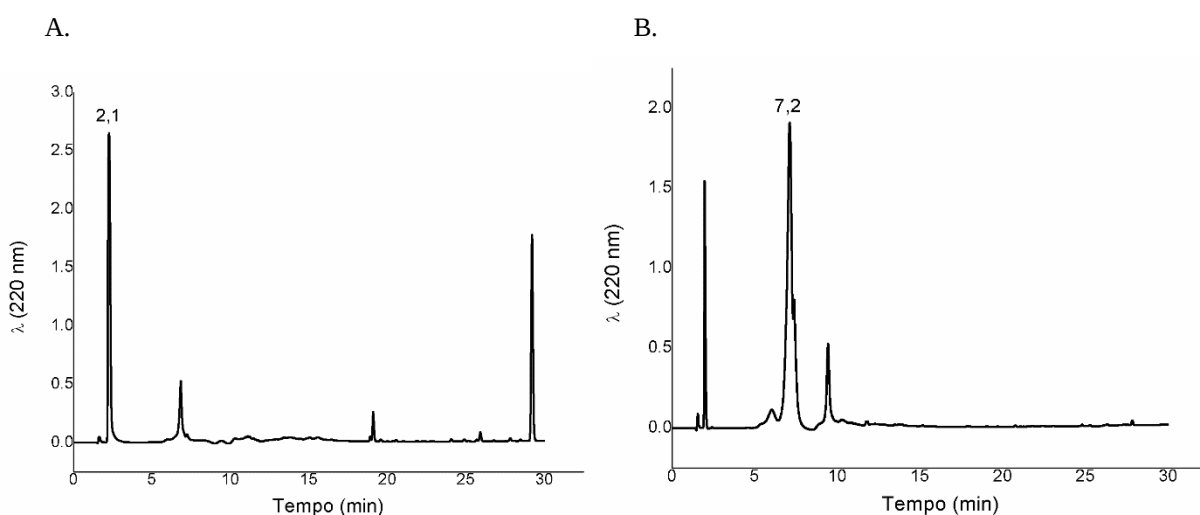


Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

O perfil cromatográfico dos peptídeos brutos GD2102 e GD2202 foi

obtido por CLAE, com tempo de retenção de 2,1 min para GD2102 e de 7,2 min para o GD2202, indicando que estes de fato eram o peptídeos em relação às suas propriedades físico-químicas listadas anteriormente, como por exemplo a sua solubilidade, questão essa analisada durante a predição destes peptídeos. Então, em seguida foi feita a purificação do material e também a identificação do pico de interesse por espectrometria de massas (Figuras 12.A e 12.B).

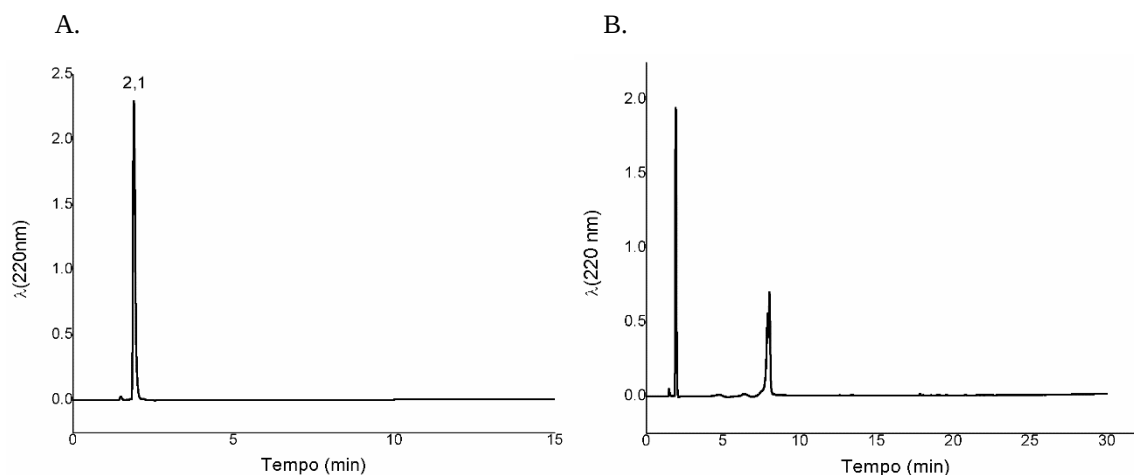
Figura 12. Perfis cromatográficos dos materiais brutos dos peptídeos GD2102 (12.A) e GD2202 (12.B) obtidos após a clivagem para a separação da resina. Os materiais brutos foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência a um gradiente de 5 a 95% de solvente B por 30 min a fluxo de 1 mL.min⁻¹. O tempo de retenção para o peptídeo GD2101 foi de 2,1 min e para o GD2202 de 7,2 min.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A purificação do peptídeo GD2202 foi realizada em sistema CLAE semi-preparativo (Figuras 13.A e 13.B) e as frações obtidas foram avaliadas em CLAE analítico. Obtendo uma pureza de 96% para o peptídeo GD2102 bruto com um rendimento de 46,88% e 94% para o peptídeo GD2202 com um rendimento de 42,72%. O peptídeo GD2202 então foi utilizado para a formulação das vacinas para posterior imunização de camundongos da linhagem Swiss.

Figura 13. Perfis cromatográficos dos materiais purificados GD2102 (13.A) e GD2202 (13.B) obtidos após purificação em sistema CLAE semi-preparativo. Os materiais purificados foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência de 5 a 95% de solvente B por 30 min a fluxo de 1 mL.min⁻¹. O tempo de retenção para o peptídeo GD2102 é de 2,1 min e do peptídeo GD2202 é de 2,5 min.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4.9 Imunização de camundongos Swiss com o peptídeo GD2202

O estudo apresentado neste trabalho buscou desenvolver uma vacina com um epítipo referente a proteína Lc24 já apresentada e estudada anteriormente por Isabel (2010), onde a mesma conseguiu comprovar a antigenicidade da proteína frente a soros de cães infectados com *L. infantum*. Tendo esse estudo como base, o trabalho aqui apresentado investiu inicialmente na expressão da proteína Lc24, mas devido ao insucesso desta etapa, utilizou-se como estratégia alternativa a síntese de peptídeos com potencial imunogênico selecionados por análises de imunoinformática. Dentre as possíveis opções identificadas nessas análises, iniciamos os estudos de imunogenicidade com a sequência GD2202, que corresponde a GD2102, adicionados de uma valina e de um peptídeo adjuvante, como descrito acima. Os estudos descritos a seguir visaram a imunização de camundongos para que então fosse feita a avaliação da produção de IgG, IgG1 e IgG2a.

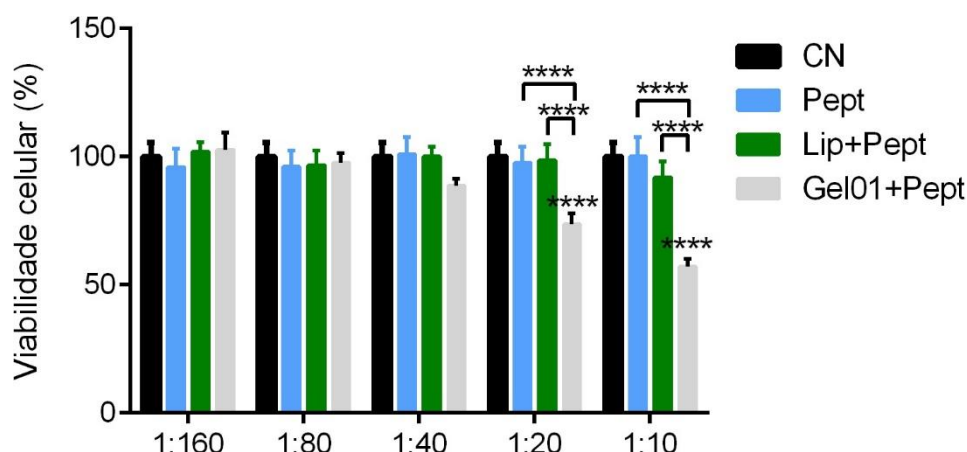
Os grupos G2, G3 e G4 foram imunizados, respectivamente com 100 μg de GD2202 em PBS, 100 μg de GD2202 + Montanide e GD2202 encapsulado em lipossomas. Para o encapsulamento do peptídeo nos lipossomas, foi utilizado 1 mg do peptídeo. Devido à carga geral positiva do peptídeo, utilizou-se lipossomas aniônicos (BERNARDI, 2015; SILVA, 2011), tendo sido realizado o teste de Pierce Assay, indicando a presença de 75% de proteína encapsulada.

4.10 Ensaio de viabilidade celular *in vitro*

Como pode ser observado na figura 14 com exceção da formulação Gel01+Pept que gerou aproximadamente 40% de toxicidade nas diluições mais concentradas testadas no estudo (1:10 e 1:20), as demais formulações não causaram citotoxicidade. A citotoxicidade da formulação Gel01+Pept, provavelmente seja parte do mecanismo de estimulação de resposta imune do adjuvante Gel01. Os adjuvantes imunológicos agem basicamente de duas formas, estimulando o sistema imune mimetizando moléculas altamente conservadas pelos microrganismos, como LPS, peptidoglicano e outros; e como sistema de liberação de antígenos (ABD EL RAHMAN et al., 2020; PENEBRA and LILLEHOJ, 2019).

Os últimos podem estimular o sistema imune através de lise celular no local da inoculação, levando à liberação de moléculas citoplasmáticas como ácido úrico, ATP e outras que são reconhecidas como um sistema de alerta por células íntegras vizinhas (Hogen et al., 2012., Batista-Duarte et al., 2013; PETROVSKY et al., 2015Mor). Essas células podem liberar citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF que ajudam na indução de resposta imune. Portuondo e colaboradores (2017), demonstraram que uma formulação vacinal desenhada contra a esporotricose (doença causada por espécies patogênica do gênero *Sporothrix*), adjuvada com o Gel01 10% gerou 40% de toxicidade na diluição 1:1 em macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c (PORTUONDO et al., 2017). No estudo o adjuvante Hidróxido de alumínio, usado na dose clínica humana (0,1 mg de Al_3^+ em camundongos) mostrou uma toxicidade maior (56%) ao Gel01. Ambas as formulações induziram resposta imune protetora em camundongos desafiados com o fungo, porém à resposta da formulação adjuvada com Gel01 foi maior.

Figura 14: Citotoxicidade das formulações vacinais. A linhagem de fibroblasto murino (L929) à concentração de 1×10^4 em meio de cultivo DMEM foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. As células aderidas foram incubadas durante 24 h, com diluições (1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160) feitas em DMEN, das formulações a seguir: Pept, Lip+Pept ou Gel01+Pept. Poços contendo somente meio DMEM foram usados como controle negativo (CN). A viabilidade celular foi determinada pela redução de resazurina. A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias e a diferença estatística foi identificada usando o teste de comparações múltiplas de Tukey e intervalo de confiança em 95%. **** (p < 0,0001) para comparação com o grupo controle (CN) ou conforme indicado.



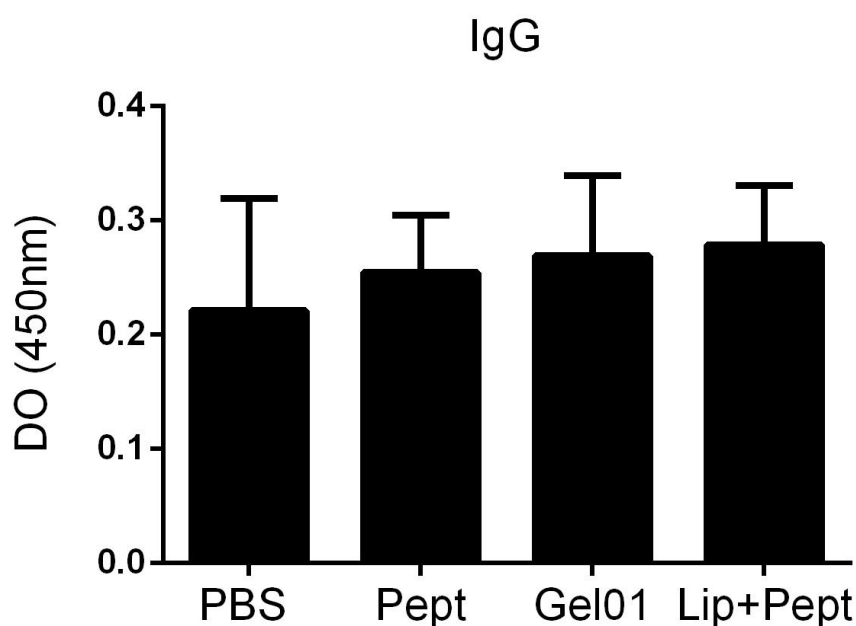
Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4.11 Resposta humoral

Durante a imunização, os camundongos Balb/c e Swiss foram pesados nos dias 0, 7, 14. O peso total de cada grupo (G1, G2, G3 e G4) foi analisado para ver se haveria alguma mudança durante as imunizações. Como os pesos apresentaram-se similares (Anexo no Quadro 29), foi determinado então que o imunizante utilizado não causou nenhum tipo de efeito tóxico no organismo dos animais, como predito nas análises *in silico*.

As imunizações foram realizadas nos dias 0, e 14, e no quarto dia após a terceira imunização (dia 18), os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para a obtenção do soro e determinação da produção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a contra o antígeno testado. Os testes de ELISA não detectaram a presença de anticorpos IgG antígenos específicos em nenhum dos camundongos testados de acordo com a avaliação de absorbância por cada poço referente aos animais vacinados (Figura 15).

Figura 15. Resposta de anticorpos IgG contra GD2202 de *L. infantum*. Cada grupo de camundongo Swiss (n=5) recebeu duas doses da formulação vacinal via subcutânea, com intervalo de 14 dias entre a primeira e a segunda dose. Quatro dias após a terceira dose, o sangue dos animais foi coletado para a obtenção do soro e determinação do título de anticorpo IgG 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⁻¹, pH 9,5) contendo o peptídeo GD2202 (20 µg.mL⁻¹). O resultado representa os valores de absorbância de anticorpos conjugados com HRP (Abcam) e diluição de 1:100 do soro de camundongos. Grupos: G1 -PBS (100 µL); G2 - GD2202 com PBS (100 µg/mL); G3 - peptídeo (100 µg) + adjuvante Montanide™ Gel 01 (10% da solução) + PBS; G4 - peptídeo (1 mg) encapsulado em lipossomas. A significância estatística foi determinada por ANOVA usando o teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95%.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Devido à inconsistência dos dados de dosagem de imunoglobulinas quando utilizado o modelo Balb/c (Anexo, Figura 16) e, considerando que há trabalhos na literatura que avaliaram aspectos de imunogenicidade de proteínas em camundongos swiss (SANTOS, 1999; NAGILL e KAUR 2011), repetimos os ensaios de imunização com este modelo, disponível no laboratório para o estudo. Como pode ser visto na Figura 15, a reatividade da resposta humoral não foi detectada neste modelo murino. Isto posto, para validar os dados *in silico*, será necessário realizar novos experimentos. Nestas novas análises é preciso considerar alguns aspectos. Alguns estudos demonstraram que os adjuvantes da linha Montanide™ tipo gel (Gel 01) exercem o seu mecanismo imunoadjuvante similar ao adjuvante hidróxido de alumínio (Al(OH)₃), liberando os antígenos adsorvidos na sua superfície no local da inoculação (VIALLE et al., 2010; CAUCHARD et al., 2014). Os antígenos liberados lentamente no local de imunização são rapidamente captados e processados pelas células

apresentadoras de antígeno (APC) e posteriormente apresentados aos linfócitos TCD4⁺ nos linfonodos regionais. Portuondo e colaboradores (2016), demonstraram que o grau de adsorção de duas concentrações de proteínas da parede celular do fungo *Sporothrix schenckii* ao HA, teve efeitos qualitativos e quantitativos no aumento e modulação da resposta imune, nos camundongos que receberam essas formulações. A formulação contendo menor quantidade de proteínas adsorvidas ao HA induziu menor quantidade de anticorpos IgG e perfil de citocinas diferentes. Levando em consideração este critério é provável que o peptídeo GD2202 não foi adsorvido eficientemente na superfície do Gel01, assim, pode ter ocorrido uma rápida dispersão no local da inoculação que limitou seu reconhecimento pelas APCs e ativação das células T. Caso tenha existido adsorção do peptídeo na superfície do adjuvante também poderia ter sofrido desnaturação e consequentemente perda dos motivos de ligação às moléculas MHC das células apresentadoras de antígenos. Esta série de eventos poderia afetar a ativação dos linfócitos T CD4⁺, a especificidade da resposta de anticorpos e, consequentemente, a eficácia da imunização. Novos adjuvantes poderão ser testados como saponina (CLASTA, 2021; SANTOS, 2021; SOUZA et al., 2004) e hidróxido de alumínio (LIMA et al., 2019).

Em relação ao peptídeo encapsulado em lipossomas, é importante enfatizar que existem dois tipos de lipossomas a serem utilizados em estudos de imunologia, os aniônicos, aqui utilizado, e os catiônicos. Os lipossomas catiônicos têm uma ligeira vantagem em relação aos aniônicos em estudos encontrados na literatura, mas isso não descarta a efetividade dos com carga negativa (BERNARDI, 2015; SILVA, 2011). O peptídeo escolhido de carga positiva não poderia ser encapsulado em lipossomas de mesma carga, devido à incompatibilidade elétrica. Portanto, em estudos futuros de predição de epítomos, será interessante, também, considerar a carga dos peptídeos como um critério de seleção. Adicionalmente, outros peptídeos indicados neste trabalho poderão ser testados sozinhos ou em associação com GD2202.

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, Isabel (2010), através de estudos de bioinformática, conseguiu identificar regiões de proteínas de *L. infantum* que teriam capacidade de serem antigênicas como a própria proteína Lc24 e também a proteína Lc36, isso confirmado pela própria autora em ensaios de antigenicidade (*immunoblotting*) e posteriormente (ISABEL, 2010). A capacidade de antigenicidade da proteína Lc36 foi confirmada por Nogueira (2016), através de ensaios enzimáticos (ELISA) realizados com essa proteína frente a soro de cães infectados com leishmaniose (NOGUEIRA, 2016). Considerando Crumpton (1974) que diz que em um evento de uma resposta celular um imunógeno pode ser também um antígeno, porém, o oposto dessa afirmação pode não estar correto, e estudos elaborados por Laurindo (2021) onde regiões de epítomos da proteína Lc36 foram analisadas

quanto a sua imunogenicidade em vacinas peptídicas e obtiveram resultados positivos, a proteína Lc24 não pode ser descartada por completo, apenas uma região dela foi analisada, outras estão disponíveis para estudos mais aprofundados e com a expectativa de, além de agirem como peptídeos antigênicos, terem a capacidade de atuar como um imunizante em uma futura vacina.

Devido às restrições de tempo que ocorreram ao longo do desenvolvimento deste trabalho, algumas adaptações nos procedimentos e metodologias desse estudo precisaram ser realizadas. Como perspectivas, temos a realização de cinética de adsorção do peptídeo, como descrito por Portuondo et al, 2016, onde foi avaliado a quantidade de tempo necessária para que o imunizante utilizado fosse adsorvido pelo adjuvante Hidróxido de Alumínio. Alternativamente ao peptídeo adjuvante RS09, outras opções poderão ser avaliadas (GUPTA et al., 2020). Estudos de vacinas peptídicas publicados geralmente não utilizam apenas um imunizante, geralmente uma quantidade maior de epítomos são selecionados e administrados em modelos murinos para que o estudo de imunogenicidade seja feito (PEREIRA et al., 2021; MACHADO, 2010; SEGER, 2014). O peptídeo GD2102 pode ser acoplado a outro epítopo da mesma proteína alterando então, possivelmente, sua carga e aumentando a sua probabilidade de induzir uma resposta imune.

5 CONCLUSÃO

Uma proteína hipotética de *L. infantum* foi o alvo de estudo deste trabalho, a Lc24. Apesar do sucesso na obtenção da sequência codificadora dessa proteína em vetor de expressão bacteriana pMAL_p5X, para *E. Coli*, não foi observado a presença da proteína nos extratos após a indução por IPTG.

A não expressão da proteína Lc24 fez com que este estudo passasse então a uma outra metodologia para trabalhar com essa sequência de modo avaliar sua imunogenicidade. Portanto, a tecnologia de imuno-informática foi aplicada e permitiu identificar sequências de aminoácidos como possíveis epítomos referentes a proteína em questão. Ao todo foram 6 peptídeos preditos pelo servidor BepiPred 2.0, 20 pelo servidor ABCpred, todos eles referentes a ligantes de linfócitos B, e então, a sobreposição dos peptídeos desses dois servidores foi feita e proporcionou 17 sequências a serem analisadas como prováveis candidatos a antígenos.

Esses peptídeos sobrepostos passaram por avaliações como prováveis ligantes de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$), como um quesito de prioridade também visando a expressão de citocinas assim como também a produção $IFN\gamma$ de extrema importância para a resposta

imune do indivíduo em uma infecção do parasita. A alergenicidade, toxicidade e uma provável similaridade dessas sequências peptídicas com o genoma de cães também foram estudadas para que o melhor candidato a epítopo fosse selecionado. O peptídeo GD2102 (HKPGGDAGRRGGAQKT) foi selecionado para ser sintetizado quimicamente e seguindo o desenho imunogênico foi adicionado um peptídeo adjuvante (RS09), após uma sequência de dois espaçadores de Arginina (RR), e uma valina no n-terminal do peptídeo para aumentar sua capacidade de meia-vida, tornando assim o peptídeo que seria utilizado na imunização (GD2202).

A vacina obtida com o peptídeo GD2202 não obteve uma reatividade considerável em relação a resposta humoral em camundongos das linhagens Balb/c e Swiss, apesar disso esse peptídeo não pode ser descartado. Algumas observações como um estudo cinético de adsorção do adjuvante utilizando (Gel01) com o peptídeo selecionado podem ser realizadas para que essa formulação tenha uma possibilidade maior para adsorção pelo adjuvante utilizado e assim, sendo apresentada às moléculas do sistema imune, possa obter uma boa reatividade em relação a resposta humoral. A utilização de lipossomas catiônicos em um estudo de imunogenicidade é importante já que são os mais utilizados nestes estudos. Lipossomas com cargas negativas podem promover uma repulsão em relação as moléculas do sistema imune, já que essas moléculas tem cargas neutras ou negativas, portanto, a utilização de um peptídeo com carga baixa para que possa ser encapsulado por lipossomas catiônicos deve ser estudada.

O uso da linhagem Balb/c para que o estudo efetuado neste trabalho, que proporcionou resultados negativos, possam ser refeitos utilizando o mesmo peptídeo e também abrangendo o estudo para os outros epítomos encontrados na predição. Um estudo de imunogenicidade geralmente é composto por vários peptídeos, o que aumenta então a possibilidade de resposta humoral referente a algum desses epítomos em estudo. Mostrando assim, que não é viável agora promover o descarte desta sequência codificadora da proteína Lc24, estudos futuros utilizando essa proteína podem obter resultados promissores.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBIATI, Thaís Carneiro et al. Leishmaniose visceral canina: Relato de caso. PUBVET Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 13, n.4, a307, p.1-8, 2019
- ABD EL RAHMAN, S.E. et al. Evaluation of The Celular and Humoral Immune Response of Sheep Vaccinated with Inactivated Rift Valley Fever Vaccine Adjuvanted with Mondatine Gel 01TM. Journal of Applied Veterinary Sciences, vol. 5 (1): 22-34. 2020
- AGALLOU, Maria et al. Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I – and class II – restricted epitopes of four known *Leishmania* infantum protein. Frontiers in IMMUNOLOGY – Immunotherapies and Vaccines. 5:268. doi:10.3389/fimmu.2014.00268. 2014
- AGALLOU, Maria et al. 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 - 0264-410X/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.089. 2011
- ALMEIDA, Ariely Nunes Ferreira de et al. Vigilância da leishmaniose cutânea em amostras clínicas: distribuição da *Leishmania* guyanensis no estado do Amapá, 2018*. Epidemiol.Serv.Saude, Brasília, 29(1):e2018504, 2020.
- ARAÚJO, Anna E. V. et al. BIO 05 - Clonagem, expressão e purificação do domínio externo da proteína de membrana externa A (OmpAExt) de *Acinetobacter baumannii*. V Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos. p. 58-59, Rio de Janeiro, Maio de 2017.
- ATANASOVA, Mariyana et al. EpiDOCK: a molecular docking-based tool for MHC class II binding prediction. Protein Engineering Design & Selection, vol. 26 no. 10 pp. 631 doi:10.1093/protein/gzt018, 2013.
- AYRES, Eveline da Cruz Boa Sorte et al. Clinical and parasitological impact of short-term treatment using miltefosine and allopurinol monotherapy or combination therapy in canine visceral leishmaniasis. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology. 31(3). 2022
- BENITES, Thais Azevedo. Peptídeos sintéticos no estudo do sistema toxina-antitoxina ParE/ParD. Dissertação – Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2017.
- BERNARDI, Daniela Spuri. Influência da iontoforese na imunização transcutânea utilizando lipossomas e nanopartículas metálicas. Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2015.
- BONGIORNO, Gioia et al. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs—A preliminary xenodiagnosis study. Veterinary Parasitology. 197, 691-695. 2013.
- BORJA-CABRERA, G.P. et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). Vaccine. 20, 3277-3284. 2002.
- BRITO, Mariane Pereira. Análise in vitro do efeito da associação da pentamidina com verapamil, anfotericina B e miltefosina contra linhagens suscetíveis e resistentes de *Leishmania* (Leishmania) amazonensis. Universidade de São Paulo – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo,

2019.

CALIXTO, Giovana Maria Fioramonti. Desenvolvimento E Caracterização De Sistemas Nanoestruturados Bioadesivos Contendo Peptídeo Análogo À Adesina Do *Streptococcus mutans*. Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2013.

CARSON, M. et al. Histag impact on structure. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, v. 63, p. 295-301, 2007.

LAURINDO, Wilquer Castro. Avaliação do potencial vacinal de derivados de duas proteínas de *Leishmania infantum* para aplicação no controle de leishmaniose visceral. Universidade Estadual de São Paulo – Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Araraquara, 2021.

CAUCHARD, S. et al. Assessment of the safety and immunogenicity of Rhodococcus equisequestered proteins combined with either a liquid nanoparticle (IMS 3012) or a polymeric (PET GEL A) water-based adjuvant in adult horses and foals—Identification of promising new candidate antigens. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 157, 164-174. 2014

CHAKRAVARTY, Jaya et al. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+ MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. Vaccine, v. 29, n. 19, p. 3531-3537, 2011. (Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10010741?via%3Dihub>)

CHEN, Chengjun et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential. Journal of Controlled Release. 142 (2010) 299–311.

CLASTA, Ricardo Birolini. Avaliação De Um Protocolo Imunoterapêutico Contra Leishmaniose Visceral Canina Utilizando Lasap Associada Ao Alopurinol. Universidade Federal da Integração Latino-Americana – Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Foz do Iguaçu, 2021.

COHEN, Stanley B. et al. Rituximab for Rheumatoid Arthritis Refractory to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy. Arthritis & Rheumatism. Vol 54, No. 9, pp. 2793-2806. DOI 10.1002/art.22025, 2006.

CONCEIÇÃO, Ana Isabel F. S. et al. Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480. 6 50-59. 2009.

CORRÊA, Ana Paula Ferreira Lopes. “Resposta humoral, carga parasitária e avaliação histopatológica na infecção experimental por *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi em camundongos BALB/c imunossuprimidos. Tese – Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2011.

COSTA, Danielle Nunes Carneiro Castro et al. Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino. Revista de Saúde Pública, v. 52, p. 92, 2018.

COSTA, Lourena Emanuele et al. Mimotope-Based Vaccines of *Leishmania infantum* Antigens and Their Protective Efficacy against Visceral Leishmaniasis. PLoS ONE 9(10): e110014. doi:10.1371/journal.pone.0110014, 2014.

CRUMPTON, MICHAEL J. Protein antigens: the molecular bases of antigenicity and immunogenicity. In: The antigens. Academic Press, 1974. p. 1-78.

DANTAS-TORRES, Filipe. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. (Readers' opinion and discussion) Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 101 (1): 117-118. 2006.

DANTAS-TORRES, Filipe et al. Vaccination against canine leishmaniasis in Brasil. International Journal for Parasitology. Vol. 50, 171-176. 2020.

DAKAPPAGARI, N. K. et al. A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2 B cell epitope peptide vaccine mediates superior antitumor responses. Journal of Immunology, v. 170, n. 8, p. 4242-4253, Apr 15 2003

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A review on biology. Epidemiology and public health significance of leishmaniasis. J Bacteriol Parasitol, v. 4, n. 166, p. 2, 2013.

DAWOUD, Marwa H. S. et al. Insulin Mucoadhesive Liposomal Gel for Wound Healing: a Formulation with Sustained Release and Extended Stability Using Quality by Design Approach. AAPS PharmSciTech (2019) 20:158 DOI: 10.1208/s12249-019-1363-6. 2019.

DHANDA, Sandeep Kumar et al. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. Biology Direct, 8:30. 2013.

DIEFFENBACH, Carl W. and FAUCI, Anthony S. The search for an HIV vaccine, the journey continues. Journal of the International AIDS Society. 23:e25506 doi.org/10.1002/jia2.25506. 2020.

DUNCAN, Ruth. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. Nature Publishing Group - Reviews, vol 6. 2006.

EMBRAPA. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN 1518-6512. 2001.

ETO, S. F. et al. Ativação de células de memória na produção de anticorpos e na expressão de células IgM positivas no baço de tilápias-do-nilo. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.70, n.1, p.205-212, 2018

FARIAS, Ticiane Carvalho. Obtenção Enzimática De Hidrolisado Protéico De Soja Com Atividade Antioxidante Para Uso Em Alimentos. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Rio de Janeiro, 2017.

FENSKE, David B. and CULLIS, Pieter R. Liposomal nanomedicines. Indorma Healthcare - Expert Opin. Drug Deliv. 5(1). 10.1517/17425247.5.1.25 © 2008 Informa UK Ltd ISSN 1742-5247

FERNANDES, Ana Paula et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. Vaccine . Vol. 26, 5888-5895. 2008.

FERNANDES, Ana Paula et al. Leishmaniose visceral canina: novos antígenos para diagnóstico e vacina. Revista de Saúde Pública do SUS/MG, v. 1, p. 49-50, 2013

FONTES, Jonathan Luís Magalhães. Detecção de Células Produtoras de Anticorpos Específicos

para *Leishmania infantum* em Tecido Esplênico. Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Medicina Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz. Salvador, BA. 2019.

GASSEN, Rodrigo Benedetti. Dinâmica das Células T Auxiliares Foliculares nas Infecções Virais: Foco em Vírus Sincicial Respiratório. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Faculdade de Medicina – Programa de Pós Graduação em Pediatria e Saúde de Criança. Porto Alegre, 2015.

GAUTAM, Shalini et al. CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases. 209:290-99. DOI: 10.1093/infdis/jit401. 2014.

GHORBANI, Masoud; FARHOUDI, Ramin. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? Drug design, development and therapy, v. 12, p. 25, 2018.

GILLSEPIE, Portia M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. Vaccine, v. 34, n. 26, p. 2992-2995, 2016.

GOMEZ, Azucena Gonzalez and HOSSEINIDOUST. Zeinab. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. ACS – Infectious Diseases, Vol 6, 896-908. 2020.

GONÇALVES, Ana Alice Maria et al. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Vol. 9. 2019.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 36(1): 71-80, jan-fev, 2003.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira Epidemiol, vol. 7, nº 3, 2004.

GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. Parasitology, v. 130, p. S27-S35, 2005.

GUPTA, Nidhi et al. Receptor-ligand based molecular interaction to discover adjuvant for immune cell TLRs to develop next-generation vaccine. International Journal of Biological Macromolecules. 152, 535-545. 2020.

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

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

HARLOW, E. and LANE, D. Antibodies: A Laboratory Manual. Biochemical Education. 17(4) 1989. pp 726. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988. \$50 ISBN 0-87969-314-2.

HOFFMAN, Kyle et al. A facile immunopeptidomics workflow for capturing the HLA-I ligandome with PEAKS Xpro. bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.20.444976>; this version posted May 22, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission). 2021

HÖGEN, Tobias et al. Two Different Binding Modes of α -Synuclein to Lipid Vesicles Depending on its Aggregation State. *Biophysical Journal*. Vol. 102, 1646-1655. 2012

ISABEL, Thais Ferreira. Leishmaniose Visceral canina: Clonagem e expressão das proteínas Lc24 e Lc36 de *L. chagasi* com potencial aplicação no diagnóstico e desenvolvimento de vacina (Doutorado). Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2010.

JACKSON, David C. et al. Totally synthetic peptide-based vaccines that target dendritic cells and induce potent antibody or CTL responses. *International Congress Series* 1289, 311-315. 2006.

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

JOSHI, Amit et al. In-silico designing of epitope-based vaccine against the seven banded grouper nervous necrosis virus affecting fish species. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics* (2021) 10:37

KALIL, Jorge et al. New Strategies in Vaccine. *Gazeta Médica da Bahia*. 78 (suplemento 1):65-71. 2008.

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

KHAN, Md Anik Ashfaq et al. An immunoinformatic approach driven by experimental proteomics: in silico design of a subunit candidate vaccine targeting secretory proteins of *Leishmania donovani* amastigotes. *Parasites & Vectors*. 13:196. 2020.

KIM, Eun et al. Microneedle array delivered recombinant coronavirus vaccines: Immunogenicity and rapid translational development. *Elsevier - EbioMedicine*. 2020

LAMOTTE, S. et al. The enemy within: Targeting host-parasite interaction for antileishmanial drug discovery. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 6, Jun 2017.

LIMA, Joelson Souza et al. O probiótico *Saccharomyces boulardii* modula a resposta de IgG2a em camundongos expostos aos antígenos de *Leishmania infantum**. *R. Bras. Ci. Vet.* Vol. 26, n 4, p 137-141. 2019.

LINDBERG, Alf A. Glycoprotein conjugate vaccines. *Vaccine*. 17, S28-S36. 1999.

MACHADO, A. et al. Chemical and enzymatic peptide syntheses: Basic aspects and applications. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 781-789, Sep-Oct 2004.

MACHADO, Christina Monerat Toledo. Uso de Peptídeo Sintético Selecionado pro PHAGE DISPLAY Para o Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2005

MANZILLO, V. Foglia. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology*. Vol. 142, 142-145. 2006

MARTINS, Prieto Martín et al. Funciones de los linfocitos B. *Medicine*. 2013;11(28):1752-9

MARTINS, V. T. 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*, v. 8, Jul 11 2015.

MAYER, Gene. Imunidade Mediada por Célular: Interações célula-célula em resposta imunes específicas. Livro: IMUNOLOGIA – Capítulo doze. 2012.

MENDES, Jéssica Mariane Ferreira. Produção e avaliação de antígenos recombinantes candidatos a componente de uma vacina contra leishmaniose visceral canina (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. 2016.

MILLER, E. M.; NICKOLOF, J. A. *Escherichia coli* Electrotransformation. In: J.A., N. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*: Humana Press, v.47, 1995. chap. Electroporation Protocols for Microorganisms, p.105-114. ISBN 978-1-59259-534-1.

MINGES-WOLS, Heather A. Plasma Cells. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES & 2005*, John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1038/npg.els.0004030. 2005.

MORENO, Javier et al. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Vol. 6. 2012.

MOYLE, Michael and TOTH, Istvan. Modern Subunit Vaccines: Development, Components, and Research Opportunities. *Chemmedchem Reviews – ChemPubSoc Europe*. Vol. 8, 360-376. 2013

NAGILL, Rajeev and KAUR, Sukhbir. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. *International Immunopharmacology*. Vol. 11, 1464-1488. 2011

NASCIMENTO, Leopoldo Fabrício Marçal do et al. Novos adjuvantes vacinais: importante ferramenta para imunoterapia da leishmaniose visceral. *HU Revista*. Vol. 44, n 3, 401-410. 2018.

NATALE, Caio Cotta et al. A importância dos modelos murinos na caracterização das respostas imunológicas às leishmanioses: uma revisão. *Atas de Ciências da Saúde, São Paulo*, Vol.4, Nº.3, pág. 35-59, JUL-SET 2016.

NEVES, Diana Brito da Justa. Concentração De Antimônio Em Plasma E Pele De Pacientes Com Leishmaniose Cutânea – Relação Com Efeitos Colaterais Após Tratamento Com Antimoniato De N-Metil-Glucamina. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. 2008.

NOGUEIRA, Camila Tita. Busca de antígenos para diagnóstico da leishmaniose visceral canina: potencial uso e aplicação da proteína rLc36. Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2014.

NOGUEIRA, Fabio dos Santos et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors*. 12:79. 2019.

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

OHNISHI, Naozumi et al. Rapid determination of the encapsulation efficiency of liposome formulation using column-switching HPLC. *International Journal of Pharmaceutics*. 441, 67-74. 2013.

OLIVA, Gaetano et al. A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons. PLOS Neglected Tropical Diseases. Vol. 8. 2014.

OLIVEIRA, Pablo Rafael Silveira. Modulação Da Ativação De Macrófagos e Agravamento Da Infecção Em Modelo Murino De Leishmaniose Tegumentar Por Moléculas De *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa. Salvador, Bahia. 2010.

OMS. Who Guideline for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in HIV Co-Infected Patient in East Africa and South-East Africa. 2022.

ONILE, Olugbenga S. et al. An immunoinformatics approach for the design of a multi-epitope subunit vaccine for urogenital schistosomiasis. PeerJ 8:e8795 DOI 10.7717/peerj.8795. 2020.

OPAS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Num. 10. 2021.

PALLAGI, Edina et al. Application of the QbD-based approach in the early development of liposomes for nasal administration. International Journal of Pharmaceutics. 562, 11-22. 2019.

PENEBRA, Alfredo and LILLEHOJ, Hyun S. Eimeria tenella Elongation Factor-1a (EF-1a) Coadministered with Chicken IL-7 (chIL-7) DNA Vaccine Emulsified in Montanide Gel 01 Adjuvant Enhanced the Immune Response to E. acervulina Infection in Broiler Chickens. Avian Diseases. 63:342-350. 2019.

PEREIRA, Nayara Gonçalves et al. Bioinformática como ferramenta na análise de epitopos antigênicos no design de vacinas contra Anaplasma marginale, Leishmania spp., SARS-Cov-2 e toxina de Clostridium septicum. Brazilian Journal of Development. Vol. 7, n 4, p 41634-41650. 2021.

PETROVSKY, Nikolai. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. Drug Saf. 38:1059-1074. 2015.

POOT, J. et al. Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. Vaccine. Vol. 24, 2460-2468. 2006.

PORTUONDO, Deivys Leandro et al. A *Sporothrix spp.* Enolase derived multi-epitope vaccine confers protective response in BALB/c mice challenged with *Sporothrix brasiliensis*. Microbial Pathogenesis. 166, 105539. 2022.

PORTUONDO, Deivys Leandro et al. Comparative efficacy and toxicity of two vaccine candidates against *Sporothrix schenckii* using either Montanide™ Pet Gel A or aluminum hydroxide adjuvants in mice. Vaccine. Vol. 35, p 4430-4436. 2017.

PULENDRAN, Bali et al. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. Nature – Reviews. Vol. 20. 2021.

QUEIROZ, Camila Marques. Avaliação Da Atividade In Vitro De Novos Compostos Heterocíclicos Frente Às Formas Promastigotas E Amastigotas De *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908). Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Medicina Tropical. Recife, 2019.

REIS, Luiza de Campos et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na

Leishmaniose Tegumentar Americana. Revista de Patologia Tropical. Vol. 35 (2): 103-115. maio-ago. 2006.

REHMAN, Abdur et al. Integrated core proteomics, subtractive proteomics, and immunoinformatics investigation to unveil a potential multi-epitope vaccine against Schistosomiasis. Vaccines. 2021, 9, 658. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060658>

REVISTA DE SAÚDE PÚBLICA DO SUS/MG. Volume 1 • Número 1 • Julho/dezembro de 2013.

REYNISSON, B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data: Nucleic Acids Research. gkaa379 2020.

RIBEIRO, Raul Rio et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies of Control. Hindawi - Biomed Research International, vol. 2018, Article ID 3296893, 12 pages, Mar. 2018.

ROCHA, Gustavo Pereira da; PETRONI, Tatiane Ferreira. Leishmaniose Visceral e Tegumentar Americana. Revista Saúde UniToledo, Araçatuba, SP, v. 01, n. 02, p. 40-55, set./nov. 2017.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! International Immunology, v. 30, n. 3, p. 103-111, Mar 2017.

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

SANTOS, Thais Teodoro de Oliveira. Avaliação da proteína fator eucarioto de alongamento 1 beta de Leishmania (EF1 β) como candidata para uso no diagnóstico e vacina contra as leishmanioses. Universidade Federal de Minas Gerais – Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, 2021.

SEGER, Juliana. Peptídeos sintéticos para diagnóstico e imunoprofilaxia da leishmaniose tegumentar americana. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

SHARMA, Amarnath and SHARMA, Uma S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. International Journal of Pharmaceutics. 154, 123-140. 1997.

SILVA, Duanne Alves. Processamento e apresentação antigênica e possíveis interferências virais. Universidade Federal de Goiás – Escola de Veterinária e Zootecnia. Goiânia, 2011.

SILVA, Nayane dos Santos Brito. Diversidade genética do gene HLA-B em populações com diferentes perfis de ancestralidade. Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina. Botucatu, 2021.

SILVA, Sonia Maria Lucas da. Lipossomas pH-Sensíveis Contendo Complexo De Ciclodextrina Catiônica/Dna Plasmidial: Otimização Do Método De Preparo, Caracterização Físico-Química E Estudo De Transfecção. Universidade Federal de Minas Gerais – Faculdade de Farmácia. Belo Horizonte, 2011.

SKWARCZYNSKI, Mariusz; TOTH, Istvan. Peptide-based synthetic vaccines. Royal Society of Chemistry – Chemical Science. Chem. Sci, 2016, 7, 842.

SLINGERLAND, Marije et al. Liposomal drug formulation in cancer therapy: 15 years along the

road. Drug Discovery Today Volume 17, Numbers 3/4 February 2012.

SOUZA, Maria Aparecida et al. The adjuvant effect of saponin (Quillaja Bark) in the vaccine against murine cutaneous leishmaniasis. *Bosci. J.*, Uberlândia, vol. 21, n. 1, p. 107-114. 2004.

SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 9, Mai. 2016.

STOCKDALE, Lisa; NEWTON, Robert. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, junho, 2013

TARANG, Shikha et al. In silico Design of a Multivalent Vaccine Against *Candida albicans*. *Science Reports – Nature Research*. 10:1066. 2020.

THOMPSON, Julie D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, Vol. 22, No. 22 4673-4680

TORCHILIN, Vladimir P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY VOLUME 4 | FEBRUARY 2005*.

TREUEL, L. et al. Physicochemical characterization of nanoparticles and their behavior in the biological environment. *Royal Society of Chemistry*. Vol 16, 15053. 2014.

UNNI, P. Ambili et al. Designing of an epitope-based peptide vaccine against walking pneumonia: an immunoinformatics approach. *Molecular Biology Reports* (2019) 46:511–527

VAN DER BURG, Sjoerd H. et al. Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58 (2006) 916–930.

VIALLE, R. et al. Microgel particulate adjuvante: characterisation and mechanisms of action. *Procedia in Vaccinology*. Vol. 2, 12-16. 2010

WU, Yanan. Structural Comparison Between MHC Classes I and II; in Evolution, a Class-II-Like Molecule Probably Came First. *Frontiers in Immunology*. Vol. 12. 2021.

YASUR-LANDAU, Daniel et al. Induction of allopurinol resistance in *Leishmania infantum* isolated from dogs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017.

ZHANG, L. et al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Nature Publishing Group – Translational Medicine*. Vol. 83, n. 5. 2008.

ZHANG, Qing et al. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic Acids Research*, v. 36, Web Server issue W513-W518, May 2008.

ANEXOS

Sequência genômica LINF_240020050: proteína de resistência a múltiplas drogas. Em destaque, região codificadora da região Lc24.

[illegible]

Sequência da proteína LINF_240020050: proteína de resistência a múltiplas drogas. Em destaque, sequência de aminoácidos que compõem a proteína Lc24; Em destaque em laranja está a sequência de resíduos de aminoácidos escolhida como imunizante para a vacina produzida (GD2102)

MLPSPNGPSSSYTWMSAHTVARGNRGCGEEFLLPKPGSRASMCRLTQSAPRTESAVPAATTSSSNLPHVAVSSLLVGDSLKGGGSTFGDGGSGSDGNGSAGGSSDANGGAGGGNGGL
AFGAAPASLSEFLRIFAYAVRLQSWASWLLAVVFHLFHLILLISFWSSPILYRSTFFSQSMAKSLLAQSVRQHRRGSDGCSNNGRTRLASAAAGKGPSGAEEAALLRSSESPAPVSVESVW
AIHDSVFFLEEGRVMPMTAIASSFSSLGGKNHHG **GTTRSTSYAGRDVRDSDADHSTGND AIDSMSQ GKPRGSPHTCILS** **HKPGGDAGRGGGAQKT** **VVSATAVSTLREATGAAAIGQSNQ**
L RPTVSWDLCSKDEDRHRAAATS DGPGLLRWFGSPPV APEHTLSQRKNLSHGLVALSQIIDAWAASPLYSSPLALALLYHLYGVACVILLT **TVTDGMLTGHFSA LR LCIALAE LLWYIR** **HG**
AHAFLIYCWMLVLSHWPHRTMCSADDA AFLQQT PYAVVT KRRGQVSMFWFYRAALAVDGAEGGGGHGGAGKLLVDEINLPYYLYDQVWYLKPLAEGIEVFYVCLLLLCLVKDFH
RVLDVAVVGRELMEPEGVCVRCLCGELMVL YEQRSLLRANSIYEPARGCISWSGWRMRWWWRWL RSPVQGSCSGHRVPTPLPSPLWRWLLPARLGGGPKLTPLAVSATAGAPTDDG
DASLTPGMGDETTFTLAEILEDVEFYEQSAVRRSAAAPQDTTTEATAHLTQWL RAMPCAARSPIVRVQDGEHSRSRARNGGFSAEQDEENAAATAGALALGLSASSSSEECVSAGLVTVA
PAAAPATPDMGAATAPAHGALTAFAKAGPPNPSPHTLVASSIPASPTRRRHGRRSQRLQ RSLNSSQQSMTPRKRLQRRTFTEEVLYWNRATRHVHRCPRLYLDAQEATDDEDDDDGS
DGGASCECSSEASSATSSTAATPTSGSLTRPATTASARAHAVNPLTAVDYANFHQGV LHRSLSPRAGPGGRAAGTGRFYMPQLSAELDEPSRVQEKRLQQSQQCTASHQGTSAADDST
HQRNDRIIGPDFSEAPSKLFAQPPPQSAAKHIVERGLYDPNKAGEDEF RPNAGFQSYDRAGYLSRLTHSWLNPLLKFGLEPTLLRQERFLPSLPEELLSLDNIAMPAWRLWVYRKVWFA
AYYAKPGELLIPGNEAMNRAEEELMSLAHLHEADRSESGEETESLDGRQTAVMLGHTSFKQAAKFRPQRPRRCWQESLLWALSAPVRCILVTLFYHVYIGTSRTVRRTRRLARELLKDR
LSTAAENLYDPNGYQTVESSEAIIEATWALTEVASSCGSSAAAPSVGSALPTHMRRQLALSDVSLYYLFLEHRCGRRLVVAAPLLLLSELLTVAVVPVLELLTMCLQRVSDMVPHRRE
APSDQSSVTEALLCANLLGVLLLLQGVVHSAYVGQAQQAAMEARTCVC VVLEKTLALPLAQRTFTEAEVVALATEEAMRVATCLRSLHLTWSCPLRVALLLLLLLANYVGWVAAAVA
GAGSLTVP LLRHSSREVRQRREARETAAPRIALLQRALRHIRKVKAMLLEGR LAHWLRKARATEASRAEAVAMAEGTAGMLAGGVECLLMVAALGAECVLSAKELRDMDVQVPAL
AIFVLLTMPLEVPALFSVVARGLAMKRIEAYLRQRPDEFAGTWVDLTSFTATQQQLRVENPGSTLLNYRRGSVVC RNSFFTQWQHDLT EEPSSALLRDVDFCIRPGQLVVVQSGMGAGK
STLLLSILGEVNL FVSSGCSTNGSSTGYRSEKTL SVVSATEAAAALAPVYTGGAPGAVGDGNRRDPGPAAAAACPPAFPTPPSNSISLADAAALGIFVASPMDSAEARRCVSAEQTL SAVPGA
DAAAAQRALAGIASTAAAAAAA AKTFMAAGGASPGGYARSEASKLSARSLADDRASVCSVTTKNASQLSPTGLEGDDSSSTGGFLVFGSCAYCAEVPWLQNDTIRANIVPGGGPVLERW
YCAVLRACALSAEVTALPHGDATVIGERGELLSLMRCRIAIARAVYSKSHVYLMDSVLSPLEPAIQEHIIREVFHRLLRKKTIVLASNVGLRSLRPHRVFSVNVGVARED TDLYTAVSSLH
ARGDEDDEEALMQRQASDCGGTAADGDDGGLLKRDSSASQAMTPPLPALYAEFEEPQEAAEAETLVKVFVDDPAVAATTVLFDGDAGFGPRDPRLLGELVDRLDAGISGDDVSLAGS
ALLAGAEGGFGNSAALRPRRSRSSCPRLPRRFKTGRSGAASGAETPPKEVPLPGTVTTNVASCQPSPYLKAPTAAPSHPAADPGAPLHGVNVDGTGCASDCSEQGSSASAGSGSNSTCSND
PCMSSHYAQLLRREPPLRRRHRLFLFIFLRFMGGQVTWVLLTALLQQGISLCVDIWTAAWLAVMAAHTTRS AVSATRAAVVGRSFSSRVAEQLYTAAVSDLA FVGVL SALCLLAMLLT
LLRARAVYVGAYGTMHFIYNQIACRVLHSPASYFDSRIIALVTRVLRDDGEVAEYRVLSTAETLLSCGAQVVLVALWNAFVNPVFILLPMAVSIFYHISQRHAVVLREVRRELGSVNG
MTNILREVYEGAPT VRCMALQDRLREEFCRALDTANTASMVAYLTD CWVELRLHVLATLAVYIAATVG VIFTFSYSHPSFTAVAVIACLRAGPVL TVMCRSLGAFTAKEWISVQRLMSL
WGAPQEPLTLVGEADLYTYSHVRRKATGPFVLEGGDDAPLLKNVRSPTASPMMGQGVRSRQREARQDAKAERCRLRHEQQNRQRLRRQQLGPAGGEDGPAESHAPASLSVFTDDSSPS
SSSRERRATGAPGDSCATTLPLELINVSARYRATLPYVLRHVNLAVFPGERLGVVGHAGQGKRSIFNVLLRLVDVIEGGGVFVDGEDAARIPYPILRSWFGLLSQEPLL VQGSWRSNLL
GYHFAHCMLMDGANGGADHLFLPTTTLACQQLQADARPTSRAAAAVTAQLAAAAGEREPLLQRGATAHTRGGTGAAAGPEDSRASVSAAENSYGSTDSAQPYMQAGGGERAHVGF
HTTADFAFRDQRTSEDGSGRGDCGVASMAAGAAARRLRDSLTSFQRCLRRRNNSDYNEHILPGSAGGGDGRRRRCSSCDTASNESHPHHLHGHA VKGLRQPVEDAVLWEALRAVGL
DAAVELSGGLDAPLVGDDLAETGLTDSQCRLCLARVVLRRPPIVLEDAVHSGAEAQTDFAIHRVLANELRESTVLIIAHRMSTLLNLCTRVVAVQGGTLMPIADLGPTLASAVTADAPG
AGDETRYAAAMRPATAVLPVVLKQLSHHLE

Quadro 12. Peptídeo GD2102 (HKPGGDAGRRGGAQKT) avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
HKPGGDAGR	0,116	-0,02	-0,003	-0,198	0,273	-0,286	-0,155	-0,215	0,356	0,254	0,254	-0,854
KPGGDAGRR	0,085	-0,198	0,052	-10,383	-0,058	-0,28	-0,001	-0,251	0,312	0,164	0,183	-0,322
PGGDAGRRG	-0,559	-0,046	0,129	-10,182	-1,01	-0,296	-0,832	-0,104	-0,797	-0,323	-0,486	-0,432
GGDAGRRGG	-0,2	-0,286	-0,164	-0,207	-1,149	-0,064	-0,31	-0,215	-0,797	-0,323	-0,084	-0,213
GDAGRRGGA	-0,2	-0,228	-0,219	-0,16	-1,184	-0,126	-0,362	-0,291	-0,283	-0,292	-0,062	-0,259
DAGRRGGAQ	-0,26	-0,335	-0,126	-0,252	-9,991	0,046	0,366	0,003	0,007	-0,01	0,25	-0,685
AGRRGGAQK	-0,192	-0,206	0,311	-0,109	-0,361	0,046	0,089	0,003	0,329	0,277	0,178	-0,281
GRRGGAQKT	-0,243	-0,31	0,068	-0,13	0,227	-0,28	-0,332	-0,251	-0,101	-0,063	-0,023	0,029
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
HKPGGDAGR	0,268	-0,395	-0,617	-0,522	-0,179	-0,454	-1,237	-0,154	0,134	-0,433	-0,425	
KPGGDAGRR	0,348	0,015	-0,243	-0,112	-0,25	-0,023	-0,877	0,202	0,423	0,104	-0,445	
PGGDAGRRG	-0,721	-0,206	-0,755	-0,232	-0,798	-0,712	-0,668	-0,559	-0,974	-0,311	-0,48	
GGDAGRRGG	-0,375	-0,182	-0,687	-0,375	-0,101	-0,714	-0,476	-0,638	-0,523	-0,569	-0,184	
GDAGRRGGA	-0,111	-0,328	-0,146	-0,305	-0,009	-0,195	-0,881	-0,545	-0,069	-0,556	-0,083	
DAGRRGGAQ	-0,448	-0,532	-0,281	-0,202	-0,595	-0,27	-0,756	-0,756	-0,566	-0,452	-0,483	
AGRRGGAQK	-0,045	-0,563	0,619	0,138	-0,446	0,257	-0,419	-0,606	-0,069	-0,151	-0,044	
GRRGGAQKT	-0,145	-0,193	-0,32	-0,087	-0,298	0,146	-0,904	-0,115	-0,148	-0,032	-0,015	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 13. Peptídeo HSTGNDAIDSMSQGKP avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DPA1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
HSTGNDAID	0,116	-0,092	-0,107	0,076	-0,519	-0,286	-0,155	-0,215	-0,017	-0,015	0,464	-0,466
STGNDAIDS	-0,155	-0,69	-0,068	-0,158	-0,59	-0,009	0,068	-0,022	-0,122	-0,205	0,304	-0,083
TGNDAIDSM	-0,004	-0,295	0,087	-0,186	-0,288	0,186	0,2	0,129	0,476	0,355	0,399	0,288
GNDIAIDSMS	-0,351	-0,315	-0,084	-0,351	-0,812	-0,224	-0,249	-0,139	-0,13	-0,189	0,043	-0,392
NDAIDSMSQ	-0,055	-0,16	-0,128	-0,305	-0,884	-0,049	0,178	0,099	0,145	0,119	0,154	-0,141
DAIDSMSQG	-0,183	-0,335	-0,026	-0,211	-10,636	0,121	0,348	0,062	-0,205	-0,244	0,36	-0,218
AIDSMSQ GK	-0,194	-0,163	0,157	-0,191	0,212	-0,093	-0,113	-0,138	0,348	0,315	0,24	-0,159
IDSMSQ GKP	0,173	-0,02	0,073	-0,121	-1,225	0,243	0,483	0,159	-0,168	-0,189	0,177	-0,152
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
HSTGNDAID	0,268	-0,395	-0,412	-0,31	0,142	-0,315	-0,999	-0,154	-0,037	-0,55	-0,037	
STGNDAIDS	0,475	-0,218	-0,031	-0,268	-0,529	0,174	0,088	-0,021	0,058	-0,161	0,009	
TGNDAIDSM	0,148	-0,116	0,068	0,137	-0,307	-0,417	-0,543	-0,755	-0,053	-0,333	0,293	
GNDIAIDSMS	-0,321	-0,446	-0,804	-0,633	-0,125	-0,391	-0,715	-0,606	-0,434	-0,498	-0,101	
NDAIDSMSQ	0,387	-0,083	0,055	-0,166	-0,325	0,937	-0,174	0,435	0,64	-0,075	-0,287	
DAIDSMSQG	-0,539	-0,253	-0,576	-0,279	-0,869	-0,105	-0,865	-0,272	-0,747	-0,043	-0,259	
AIDSMSQ GK	0,273	-0,296	0,287	0,208	-0,442	0,714	-0,078	0,016	0,114	0,26	-0,044	
IDSMSQ GKP	0,468	0,49	-0,066	-0,265	-0,086	-0,015	0,067	0,633	0,057	0,099	-0,351	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 14. Peptídeo DSMSQGKPRGSPHTCI avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
DSMSQGKPR	-0,26	-0,35	-0,006	0,093	-9,097	-0,264	0,098	-0,23	0,558	0,366	0,436	-0,772
SMSQGKPRG	-0,109	-0,131	0,224	-10,229	-0,492	0,311	0,309	0,11	-0,691	-0,915	-0,645	-0,008
MSQGKPRGS	-0,704	-0,142	0,089	-0,261	-0,108	-0,682	-0,183	-0,436	-0,722	-0,268	0,293	-0,124
SQGKPRGSP	-0,112	-0,117	0,076	-0,604	-0,172	0,3	0,238	0,207	-0,168	-0,189	0,067	-0,48
QGKPRGSPH	0,111	-0,178	0,277	0,074	0,339	-0,795	-0,398	-0,416	0,402	0,287	0,448	-0,507
GKPRGSPHT	-0,276	-0,224	0,02	-0,363	-0,493	0,217	0,074	0,095	-0,521	-0,76	-0,839	-0,277
KPRGSPHTC	-0,775	-0,198	0,099	-0,319	0,052	-0,682	-0,15	-0,436	-0,201	-0,327	0,083	-0,026
PRGSPHCI	-0,439	-0,07	0,042	-0,254	0,144	0,057	-0,922	-0,24	0,127	0,038	-0,434	-0,636
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
DSMSQGKPR	0,209	-0,335	-0,715	-0,401	-0,612	-0,195	-0,438	-0,053	-0,061	-0,341	-0,769	
SMSQGKPRG	0,237	-0,167	0,247	-0,227	-0,175	0,21	-0,213	0,555	0,449	0,03	-0,074	
MSQGKPRGS	-0,797	-0,177	-0,465	-0,218	0,058	-0,929	-0,898	-0,556	-0,845	-0,387	0,302	
SQGKPRGSP	-0,224	-0,084	-0,799	-0,919	-0,519	-0,711	-0,736	-0,97	-0,347	-0,922	-0,672	
QGKPRGSPH	-1,053	-0,694	-0,366	-0,033	-0,341	-0,719	-0,486	-1,212	-0,929	-0,81	-0,231	
GKPRGSPHT	0,221	-0,393	0,38	-0,029	0,011	0,356	-0,021	0,39	0,357	0,195	-0,015	
KPRGSPHTC	-0,831	-0,334	-0,374	-0,295	0,102	-0,369	-0,849	-0,415	-0,775	-0,52	0,212	
PRGSPHCI	-0,156	-0,48	-0,504	-0,258	-0,204	-0,214	-0,239	-0,206	-0,453	-0,35	-0,399	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 15. Peptídeo RSTSYAGRDVRDSDDA avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
RSTSYAGRD	0,087	-0,209	0,1	-10,22	-0,221	-0,109	-0,005	-0,174	-0,061	-0,105	0,393	-0,223
STSYAGRDV	-0,186	-0,69	-10,081	0,118	-1,033	0,194	0,446	0,452	-0,542	-0,164	0,098	0,172
TSYAGRDVR	-0,011	-0,305	0,21	-0,139	0,419	-0,064	-0,095	-0,215	0,545	0,399	0,462	-0,534
SYAGRDVRD	-0,263	-0,016	0,221	-9,783	0,179	-0,286	-0,16	-0,215	-0,098	-0,001	-0,373	-0,656
YAGRDVRDS	0,502	0,037	0,14	-0,164	-0,891	0,362	-0,113	0,199	-0,722	-0,268	0,522	0,331
AGRDVRDSD	-0,118	-0,206	0,088	-0,421	-0,59	0,013	-0,106	-0,088	0,172	0,13	0,303	-0,494
GRDVRDSD	-0,351	-0,31	-0,247	-0,087	-0,358	-0,169	-0,198	-0,016	0,068	-0,003	-0,049	-0,515
RDVRDSDDA	0,054	-0,141	-0,17	0,047	-0,889	0,217	0,278	0,095	-0,05	-0,057	0,399	-0,283
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
RSTSYAGRD	0,214	-0,207	-0,467	-0,061	-0,142	0,124	-0,021	0,116	-0,195	-0,095	-0,415	
STSYAGRDV	-0,669	-0,229	-0,654	-0,12	-0,543	-0,617	-0,2	-0,921	-0,508	-0,382	-0,039	
TSYAGRDVR	0,186	-0,109	-0,689	-0,382	-0,249	-0,727	-0,895	-0,578	-0,056	-0,512	-0,468	
SYAGRDVRD	0,077	-0,626	-0,545	-0,541	-0,028	-0,326	-1,169	-0,193	-0,119	-0,781	-0,196	
YAGRDVRDS	-0,324	0,275	-0,016	0,492	-0,154	-0,651	-0,198	-0,049	-0,437	0,625	0,295	
AGRDVRDSD	-0,048	-0,449	-0,362	-0,343	-0,818	-0,878	-1,218	-0,984	-0,566	-0,856	-0,193	
GRDVRDSD	-0,535	-0,395	-0,964	-0,507	-0,324	-0,387	-0,651	-0,525	-0,618	-0,556	-0,306	
RDVRDSDDA	-0,331	-0,346	-0,359	-0,065	-0,509	-0,113	-0,85	-0,443	-0,561	0,257	-0,192	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 16. Peptídeo GRDVRDSDDADHSTGN avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
GRDVRDSDD	-0,351	-0,31	-0,247	-0,087	-0,358	-0,169	-0,198	-0,016	0,068	-0,003	-0,049	-0,515
RDVRDSDDA	0,054	-0,141	-0,17	0,047	-0,889	0,217	0,278	0,095	-0,05	-0,057	0,399	-0,283
DVRDSDDAD	-0,337	-0,247	-0,077	-0,069	-10,637	-0,147	0,232	-0,012	0,172	0,13	0,393	-0,909
VRDSDDADH	-0,093	-0,158	0,106	-0,072	-0,518	-0,115	0,091	-0,138	0,317	0,275	0,066	-0,453
RDSDDADHS	0,087	-0,141	-0,077	0,061	-0,945	-0,141	0,047	-0,048	-0,026	-0,056	0,399	-0,068
DSDDDHST	-0,337	-0,35	-0,125	-0,36	-9,883	-0,147	0,232	-0,012	-0,219	-0,327	0,169	-0,618
SDDADHSTG	-0,066	-0,088	-0,111	-0,243	-1,674	-0,052	-0,228	-0,241	-0,205	-0,244	0,225	-0,247
DDADHSTGN	-0,262	-0,282	-10,321	0,001	-20,674	-0,125	0,216	-0,012	0,028	0,034	0,226	-0,515
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
GRDVRDSDD	-0,535	-0,395	-0,964	-0,507	-0,324	-0,387	-0,651	-0,525	-0,618	-0,556	-0,306	
RDVRDSDDA	-0,331	-0,346	-0,359	-0,065	-0,509	-0,113	-0,85	-0,443	-0,561	0,257	-0,192	
DVRDSDDAD	-0,341	-0,682	-1,013	-0,576	-0,787	-0,865	-1,403	-0,94	-0,859	-0,812	-0,381	
VRDSDDADH	0,545	-0,271	0,268	-0,028	0,484	0,015	0,112	0,106	0,115	-0,098	0,083	
RDSDDADHS	-0,06	-0,167	-0,482	-0,187	-0,612	-0,147	-0,713	-0,298	-0,496	0,021	-0,21	
DSDDDHST	-0,556	-0,682	-0,845	-0,555	-0,698	-0,34	-0,907	-0,629	-0,696	-0,623	-0,09	
SDDADHSTG	-0,146	-0,327	-0,712	-0,52	-0,117	-0,277	-0,71	-0,466	-0,249	-0,416	-0,074	
DDADHSTGN	0,191	-0,225	-0,365	-0,146	-1,09	-0,06	-0,514	0,005	-0,196	-0,151	-0,385	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 17. Peptídeo KPGGDAGRRGGAQKTV avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
KPGGDAGRR	0,085	-0,198	0,052	-10,383	-0,058	-0,28	-0,001	-0,251	0,312	0,164	0,183	-0,322
PGGDAGRRG	-0,559	-0,046	0,129	-10,182	-1,01	-0,296	-0,832	-0,104	-0,797	-0,323	-0,486	-0,432
GGDAGRRGG	-0,2	-0,286	-0,164	-0,207	-1,149	-0,064	-0,31	-0,215	-0,797	-0,323	-0,084	-0,213
GDAGRRGGA	-0,2	-0,228	-0,219	-0,16	-1,184	-0,126	-0,362	-0,291	-0,283	-0,292	-0,062	-0,259
DAGRRGGAQ	-0,26	-0,335	-0,126	-0,252	-9,991	0,046	0,366	0,003	0,007	-0,01	0,25	-0,685
AGRRGGAQK	-0,192	-0,206	0,311	-0,109	-0,361	0,046	0,089	0,003	0,329	0,277	0,178	-0,281
GRRGGAQKT	-0,243	-0,31	0,068	-0,13	0,227	-0,28	-0,332	-0,251	-0,101	-0,063	-0,023	0,029
RRGGAQKTV	0,134	-0,223	-10,078	-0,291	0,552	-0,129	-0,048	-0,332	0,167	0,015	0,293	-0,124
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
KPGGDAGRR	0,348	0,015	-0,243	-0,112	-0,25	-0,023	-0,877	0,202	0,423	0,104	-0,445	
PGGDAGRRG	-0,721	-0,206	-0,755	-0,232	-0,798	-0,712	-0,668	-0,559	-0,974	-0,311	-0,48	
GGDAGRRGG	-0,375	-0,182	-0,687	-0,375	-0,101	-0,714	-0,476	-0,638	-0,523	-0,569	-0,184	
GDAGRRGGA	-0,111	-0,328	-0,146	-0,305	-0,009	-0,195	-0,881	-0,545	-0,069	-0,556	-0,083	
DAGRRGGAQ	-0,448	-0,532	-0,281	-0,202	-0,595	-0,27	-0,756	-0,756	-0,566	-0,452	-0,483	
AGRRGGAQK	-0,045	-0,563	0,619	0,138	-0,446	0,257	-0,419	-0,606	-0,069	-0,151	-0,044	
GRRGGAQKT	-0,145	-0,193	-0,32	-0,087	-0,298	0,146	-0,904	-0,115	-0,148	-0,032	-0,015	
RRGGAQKTV	0,023	-0,096	-0,341	0,023	0,077	0,402	-0,778	0,306	0,031	0,028	-0,258	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 18. Peptídeo TCILSHKPGGDAGRRG avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
TCILSHKPG	0,035	-0,253	0,157	-0,216	-0,258	-0,055	-0,081	-0,04	-0,088	-0,144	0,421	0,086
CIILSHKPGG	0,034	-0,196	-0,033	-0,283	-0,854	0,137	0,164	-0,124	-0,691	-0,915	-0,585	-0,203
ILSHKPGGD	-0,734	-0,045	0,062	-0,224	-0,085	-0,256	0,359	0,069	-0,061	-0,105	0,188	-0,191
LSHKPGGDA	0,121	-0,083	0,171	-0,372	-0,233	-0,009	0,357	0,191	-0,283	-0,292	0,241	0,639
SHKPGGDAG	-0,186	-0,082	0,164	0,184	-0,374	-0,795	-0,554	-0,416	-0,101	-0,111	0,078	-0,474
HKPGGDAGR	0,116	-0,02	-0,003	-0,198	0,273	-0,286	-0,155	-0,215	0,356	0,254	0,254	-0,854
KPGGDAGRR	0,085	-0,198	0,052	-10,383	-0,058	-0,28	-0,001	-0,251	0,312	0,164	0,183	-0,322
PGGDAGRRG	-0,559	-0,046	0,129	-10,182	-1,01	-0,296	-0,832	-0,104	-0,797	-0,323	-0,486	-0,432
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
TCILSHKPG	0,238	-0,055	-0,317	-0,413	-0,656	-0,115	-0,142	0,134	0,384	-0,242	0,042	
CIILSHKPGG	0,728	-0,043	0,536	-0,029	0,523	0,599	0,612	1,055	0,519	0,303	-0,015	
ILSHKPGGD	-0,564	0,136	-0,1	-0,022	-0,01	-0,85	-0,077	-0,601	-0,728	-0,307	0,125	
LSHKPGGDA	0,147	0,466	0,42	0,211	0,337	0,16	0,433	-0,251	0,523	0,361	0,327	
SHKPGGDAG	-0,775	-0,718	-0,324	-0,286	-0,29	-0,901	-0,618	-1,268	-0,965	-0,889	-0,074	
HKPGGDAGR	0,268	-0,395	-0,617	-0,522	-0,179	-0,454	-1,237	-0,154	0,134	-0,433	-0,425	
KPGGDAGRR	0,348	0,015	-0,243	-0,112	-0,25	-0,023	-0,877	0,202	0,423	0,104	-0,445	
PGGDAGRRG	-0,721	-0,206	-0,755	-0,232	-0,798	-0,712	-0,668	-0,559	-0,974	-0,311	-0,48	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 19. Peptídeo GGAQKTVVSATAVSTL avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
GGAQKTVVS	-0,264	-0,286	-0,02	0,027	0,288	0,152	0,045	0,15	-0,296	-0,187	0,082	0,165
GAQKTVVSA	-0,213	-0,281	-0,054	-0,306	-0,343	0,307	0,218	0,387	-0,32	-0,188	0,126	0,406
AQKTVVSAT	-0,131	-0,177	0,168	0,237	-0,241	0,105	0,023	0,102	-0,035	-0,089	0,082	0,1
QKTVVSATA	0,109	-0,116	0,117	-0,163	-0,35	-0,147	0,083	-0,016	-0,239	-0,202	0,242	0,216
KTVVATAV	0,085	-0,647	-10,053	0,194	-0,207	-0,163	0,102	-0,052	0,017	-0,057	0,503	0,452
TVVSATAVS	-0,075	-0,202	0,166	-0,093	-0,588	-0,022	0,065	-0,084	-0,215	-0,201	0,285	0,163
VVSATAVST	0,015	-0,041	0,192	-0,068	0,043	-0,218	-0,011	-0,175	-0,201	-0,087	0,267	0,423
VSATAVSTL	0,045	-0,144	0,265	0,005	-0,304	0,105	0,211	0,102	0,22	0,171	0,392	0,519
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
GGAQKTVVS	0,015	-0,058	0,199	-0,112	-0,487	-0,001	-0,444	0,128	0,009	-0,038	-0,101	
GAQKTVVSA	-0,023	0,139	0,196	-0,116	0,087	0,403	0,201	-0,112	0,253	0,127	-0,083	
AQKTVVSAT	-0,293	-0,312	-0,106	-0,133	-0,484	0,113	-0,147	-0,386	0,012	-0,093	0,098	
QKTVVSATA	0,329	0,052	0,073	-0,122	0,087	0,883	0,336	0,502	0,164	0,32	-0,075	
KTVVATAV	0,341	0,212	0,114	0,134	0,011	0,417	0,414	0,44	0,31	0,309	0,1	
TVVSATAVS	0,705	-0,059	0,205	-0,039	0,025	0,399	0,195	0,311	0,169	0,11	0,125	
VVSATAVST	0,744	0,335	0,662	0,295	0,772	0,537	0,619	0,849	0,627	0,408	0,307	
VSATAVSTL	-0,084	0,17	0,454	0,522	0,175	0,323	0,521	0,096	0,351	0,572	0,54	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 20. Peptídeo DLCSKDEDRHRAAATS avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
DLCSKDEDR	-0,337	-0,307	-0,162	-0,191	-8,783	-0,115	0,18	-0,138	0,443	0,272	0,229	-1,247
LCSKDEDRH	0,065	-0,031	0,326	-9,974	-0,209	0,279	0,481	0,128	0,506	0,42	0,385	0,621
CSKDEDRHR	-0,12	-0,249	0,075	0,162	-1,103	-0,147	0,065	-0,012	-0,151	0,187	0,109	-1,121
SKDEDRHRA	-0,112	-0,084	0,164	-10,139	-0,429	0,153	0,043	0,016	-0,338	-0,428	-0,025	-0,058
KDEDRHRAA	0,174	-0,045	-0,203	0,132	-0,68	0,025	0,085	-0,114	-0,746	-0,269	0,135	-0,126
DEDRHRAA	-0,186	-0,224	-0,126	0,041	-10,177	0,355	0,387	0,019	-0,239	-0,202	0,088	-0,573
EDRHRAAAT	-0,112	-9,935	-0,297	-0,001	-10,743	0,146	0,462	0,254	-0,12	-0,101	0,309	0,144
DRHRAAATS	-0,229	-0,364	0,002	-0,333	-10,408	0,201	0,417	0,059	-0,215	-0,201	0,053	-0,371
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
DLCSKDEDR	0,035	-0,722	-1,306	-0,788	-0,65	-0,784	-0,996	-0,795	-0,615	-0,62	-0,769	
LCSKDEDRH	-0,029	0,335	0,171	0,239	0,39	0,276	0,017	-0,178	0,19	0,624	0,171	
CSKDEDRHR	-0,432	-0,449	-1,092	-0,555	-1,076	-1,262	-1,287	-0,694	-0,606	-0,462	-0,525	
SKDEDRHRA	-0,593	-0,165	-0,437	-0,339	-0,874	-0,338	-0,585	-0,888	-0,757	-0,712	0,027	
KDEDRHRAA	-0,287	-0,252	-0,537	-0,208	-0,583	-0,721	-0,775	-0,476	-0,494	-0,157	0,166	
DEDRHRAA	-0,304	-0,655	-0,252	-0,374	-0,515	-0,456	-0,742	-0,867	-0,536	-0,554	-0,158	
EDRHRAAAT	0,114	0,133	-0,071	-0,004	-0,06	0,212	0,194	-0,05	-0,07	0,252	-0,016	
DRHRAAATS	-0,094	-0,52	-0,182	-0,303	-0,584	0,047	-0,571	-0,328	-0,382	-0,028	-0,176	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 21. Peptídeo GQSNQLRPTVSWDLCS avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DPA1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
GQSNQLRPT	-0,19	-0,257	0,008	0,068	-0,887	0,166	0,034	0,073	-0,627	-0,168	-0,239	-0,421
QSNQLRPTV	0,185	-0,188	-9,96	-0,358	-0,501	0,219	0,253	0,02	-0,436	-0,756	-0,336	-0,047
SNQLRPTVS	-1,015	-0,175	0,159	-0,368	0,057	-0,623	-0,215	-0,159	-0,163	-0,161	0,237	0,049
NQLRPTVSW	-0,043	-0,189	0,008	0,001	0,282	0,288	0,397	0,149	0,346	0,582	0,074	-0,411
QLRPTVSWD	0,172	-0,145	0,26	-0,018	-0,561	-0,479	-0,256	-0,22	0,068	-0,003	0,352	-0,512
LRPTVSWDL	0,119	-0,097	0,186	-0,013	0,009	-0,04	0,147	-0,002	-0,64	-0,696	-0,85	0,428
RPTVSWDLC	0,023	-0,294	0,074	-0,049	-0,176	-0,358	-0,843	-0,875	0,087	0,044	0,318	0,165
PTVSWDLCS	-0,636	-0,59	0,048	-0,03	0,25	-0,115	-0,802	-0,138	-0,262	-0,126	-0,432	-0,774
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
GQSNQLRPT	-0,963	-0,426	-0,735	-0,329	-0,7	-1,156	-0,72	-1,298	-1,148	-0,973	-0,015	
QSNQLRPTV	0,063	-0,325	0,03	-0,219	-0,052	-0,461	-0,278	-0,108	0,319	-0,635	-0,141	
SNQLRPTVS	-0,556	-0,265	-0,471	-0,617	-1,056	-0,627	-0,175	-0,48	-0,461	-0,661	0,009	
NQLRPTVSW	0,011	-0,432	-0,033	-0,116	-0,216	-0,124	-0,25	-0,182	0,18	0,107	-0,25	
QLRPTVSWD	-0,996	-0,628	-0,582	-0,064	-0,55	-0,882	-0,621	-1,053	-1,06	-0,839	-0,298	
LRPTVSWDL	0,939	0,185	1,228	0,537	0,732	1,161	1,184	1,221	1,398	0,827	0,628	
RPTVSWDLC	-0,157	0,059	-0,393	-0,099	0,096	0,203	-0,492	-0,142	-0,288	0,074	-0,146	
PTVSWDLCS	0,308	-0,633	-0,396	-0,613	0,149	-0,108	-0,206	-0,132	-0,491	-0,457	-0,397	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 22. Peptídeo HRAAATSDGPGLLRWF avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DPA1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
HRAAATSDG	0,203	-0,106	-0,098	0,161	-0,307	-0,131	-0,075	-0,085	-0,205	-0,244	0,256	0,339
RAAATSDGP	0,054	-0,194	0,106	-0,033	0,354	-0,202	-0,061	-0,139	0,065	0,046	0,55	-0,613
AAATSDGPG	-0,269	-0,201	0,186	-0,069	-1,053	-0,062	-0,037	-0,002	-0,334	-0,346	0,171	-0,606
AATSDGPGL	-0,192	-0,201	0,147	-0,471	-0,82	-0,264	-0,179	-0,23	-0,266	-0,5	-0,566	0,293
ATSDGPGLL	-1,021	-0,75	0,19	-0,057	-0,604	-0,543	-0,225	-0,233	0,091	0,069	0,132	-0,111
TSDGPGLLR	-0,085	-0,305	0,121	-0,141	0,8	-0,435	-0,168	-0,307	0,309	0,329	0,206	-0,468
SDGPGLRW	-0,102	-0,088	0,018	-10,283	-0,626	-0,465	-0,396	-0,265	0,38	0,643	0,035	-0,99
DGPGLRWF	-0,176	-0,34	0,177	0,06	-10,495	-0,105	0,133	-0,156	0,203	0,567	0,077	-0,228
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
HRAAATSDG	0,204	0,272	-0,155	0,079	0,114	0,063	-0,12	0,105	0,101	0,155	0,085	
RAAATSDGP	0,142	0,058	-0,949	-0,645	-0,255	-0,244	-0,83	0,091	-0,632	-0,32	-0,891	
AAATSDGPG	-0,281	-0,765	-0,289	-0,739	-0,392	-0,173	-0,373	-0,65	-0,084	-0,587	-0,071	
AATSDGPGL	0,671	-0,366	0,714	-0,026	0,555	0,527	0,668	0,396	0,689	-0,117	0,331	
ATSDGPGLL	-0,664	-0,663	0,04	-0,363	-0,393	-0,349	-0,52	-0,961	-0,656	-0,667	0,331	
TSDGPGLLR	0,782	-0,132	-0,121	-0,259	-0,126	-0,168	-0,915	0,125	0,385	-0,278	-0,468	
SDGPGLRW	-0,585	-0,948	-0,167	-0,411	0,296	-1,227	-0,15	-1,354	-0,702	-1,247	-0,261	
DGPGLRWF	-0,994	-0,504	-0,579	-0,115	0,244	-0,701	-0,962	-1,112	-0,485	-0,523	0,081	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 23. Peptídeo STLREATGAAAIGQSN avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DPA1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
STREATG	-0,155	-0,69	0,057	0,006	-0,734	0,201	0,2	0,059	-0,187	-0,162	0,354	-0,173
TLREATGAA	-0,075	-0,262	0,192	-0,196	-0,567	0,086	0,206	0,146	-0,283	-0,292	0,127	0,317
LREATGAAA	0,121	-0,097	0,066	0,126	-0,406	-0,373	-0,05	-0,231	-0,239	-0,202	0,025	0,396
REATGAAAI	0,087	-0,083	0,132	0,289	0,188	-0,056	0,055	-0,038	0,075	-0,002	0,212	-0,042
EATGAAAIG	-0,112	-9,988	-0,238	0,076	-10,617	-0,28	-0,002	-0,251	-0,29	-0,256	0,46	-0,141
ATGAAAIGQ	-0,161	-0,75	0,03	-0,299	-0,149	-0,218	-0,199	-0,175	0,144	0,076	0,209	-0,156
TGAAAIGQS	-0,004	-0,295	0,169	-0,014	-0,733	0,109	0,077	0,002	-0,259	-0,291	0,223	0,34
GAAAIGQSN	-0,274	-0,281	-10,104	-0,041	-10,183	-0,373	-0,331	-0,231	-0,005	0,032	0,225	-0,126
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
STREATG	-0,057	-0,485	-0,057	-0,204	-0,846	-0,147	-0,61	-0,417	-0,153	0,02	0,027	
TLREATGAA	-0,042	0,199	0,173	0,025	-0,608	0,166	-0,191	-0,359	-0,188	-0,078	0,143	
LREATGAAA	0,725	0,334	0,517	0,211	0,63	0,284	0,482	0,421	0,448	0,187	0,327	
REATGAAAI	0,027	-0,219	-0,218	0,015	-0,015	0,465	0,405	0,204	0,108	0,077	-0,212	
EATGAAAIG	0,313	-0,11	-0,13	-0,157	0,129	0,343	-0,543	0,258	0,1	-0,005	-0,185	
ATGAAAIGQ	0,662	-0,147	0,226	-0,221	0,194	0,449	0,111	0,268	0,34	-0,249	-0,295	
TGAAAIGQS	0,338	0,051	0,011	-0,136	0,159	-0,083	-0,065	-0,316	0,214	-0,382	0,125	
GAAAIGQSN	-0,144	-0,059	-0,554	-0,147	-0,401	-0,253	-0,363	-0,262	-0,449	-0,431	-0,31	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 24. Peptídeo LLRWFAGSPPVAPEHT avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
LLRWFAGSP	0,152	-0,04	0,304	-0,548	-0,041	0,36	0,628	0,395	-0,168	-0,189	0,082	-0,126
LRWFAGSPP	0,121	-0,097	0,375	0,217	0,163	0,166	0,569	0,584	-0,039	-0,087	0,084	0,135
RWFAGSPPV	0,054	-0,021	-9,826	-0,234	0,242	-0,202	-0,061	-0,139	-0,436	-0,756	-1,344	0,02
WFAGSPPVA	-0,509	-0,079	0,45	-0,355	-0,17	-0,682	-1,032	-0,436	-0,64	-0,861	-0,749	0,388
FAGSPPVAP	-0,495	0,064	0,26	0,002	0,918	-0,511	-0,476	-0,359	-0,205	-0,085	0,583	-0,457
AGSPPVAPE	-0,131	-0,206	0,084	0,062	-0,875	-0,479	-0,472	-0,22	0,103	0,118	0,178	-0,641
GSPVAPEH	-0,243	-0,296	-0,01	-0,435	-0,386	-0,64	-0,644	-0,36	-0,084	-0,384	-0,629	-0,61
SPPVAPEHT	-1,015	-0,241	0,124	-0,013	-0,369	-0,565	-0,237	-0,237	-0,033	-0,083	0,153	-0,015
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
LLRWFAGSP	0,223	0,721	-0,158	-0,357	-0,881	-0,381	-0,069	0,091	0,104	0,071	-0,372	
LRWFAGSPP	-0,124	0,682	-0,499	-0,369	-0,504	-0,762	-0,322	-0,003	-0,084	0,045	-0,372	
RWFAGSPPV	0,585	0,058	0,063	0,031	0,721	0,707	0,565	0,971	0,623	0,171	-0,258	
WFAGSPPVA	0,228	0,355	0,188	0,378	1,335	-0,183	0,397	0,843	0,378	0,158	0,567	
FAGSPPVAP	0,315	0,162	-0,028	-0,334	0,418	-0,865	0,161	0,485	-0,555	-0,459	-0,078	
AGSPPVAPE	-0,431	-0,718	0,224	-0,05	-0,235	-0,423	-0,229	-0,788	-0,73	-1,01	-0,273	
GSPVAPEH	-0,303	-0,672	0,383	-0,011	0,327	-0,012	0,309	-0,107	-0,082	-0,553	-0,239	
SPPVAPEHT	-0,658	-0,379	-0,69	-0,47	0,002	-0,316	-0,235	-0,85	-0,975	-0,597	0,095	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 25. Peptídeo PVAPEHTLSQRKNLSH avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
PVAPHTLS	-0,439	0,047	0,201	0,168	-0,639	-0,474	-1,357	-0,426	-0,163	-0,161	-0,219	-1,026
VAPHTLSQ	-0,006	-0,129	0,249	-0,391	0,422	0,086	0,26	0,146	0,004	0,155	0,183	0,05
APHTLSQR	-0,108	-0,301	0,052	0,003	-0,131	0,321	0,32	0,349	0,441	0,266	0,049	-0,809
PHHTLSQRK	-0,561	0,07	0,421	-10,173	0,359	-0,04	-0,758	-0,002	0,348	0,315	-0,39	-0,454
EHHTLSQRKN	-0,065	-9,929	-10,191	-0,039	-20,854	-0,07	0,203	-0,055	-0,531	-0,073	-0,084	0,031
HTHTLSQRKNL	0,267	-0,626	0,057	0,333	0,274	0,045	-0,093	-0,214	0,337	0,271	0,522	0,297
THHTLSQRKNLS	-0,008	-0,262	0,17	-0,274	0,339	0,311	0,383	0,11	-0,021	-0,077	0,271	0,176
LHTLSQRKNLSH	0,2	-0,083	0,212	-0,46	1,023	0,356	0,414	0,094	0,27	0,35	0,161	-0,38
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
PVAPHTLS	-1,156	-0,898	-0,496	-0,46	-0,534	-0,824	-0,577	-1,056	-1,222	-0,882	-0,397	
VAPHTLSQ	0,65	0,508	0,85	0,383	-0,038	0,257	0,158	0,255	-0,063	0,041	-0,086	
APHTLSQR	-0,846	-0,292	-0,828	-0,662	-1,077	-1,376	-1,238	-1,432	-0,828	-0,847	-0,581	
PHHTLSQRK	-0,538	-0,188	-0,088	0,328	-0,526	0,811	0,141	0,043	-0,183	0,428	-0,453	
EHHTLSQRKN	-0,31	0,251	-0,818	-0,002	-0,99	-0,405	-0,133	0,18	-0,261	0,037	-0,311	
HTHTLSQRKNL	0,482	-0,192	0,137	0,148	0,372	0,107	0,305	-0,079	0,36	-0,112	0,487	
THHTLSQRKNLS	0,041	-0,06	-0,111	-0,114	-0,736	-0,099	-0,804	-0,214	-0,172	0,195	0,125	
LHTLSQRKNLSH	0,486	-0,434	0,383	0,006	0,205	-0,089	-0,345	-0,015	0,041	0,158	0,171	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 26. Peptideo IDAWAASPLYSSPLAL avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provavel ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma

possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
IDAWAASPL	0,126	-0,02	0,127	0,111	-1,044	0,36	0,723	0,395	0,22	0,171	0,287	0,895
DAWAASPLY	-0,262	-0,335	-10,001	-0,015	-10,042	-0,202	0,093	-0,139	0,253	0,085	-0,487	-0,204
AWAASPLYS	-1,021	-0,028	0,243	-0,117	-0,071	-0,62	-0,348	-0,36	-0,262	-0,126	-0,89	-0,21
WAASPLYSS	0,404	0,123	0,375	0,001	0,258	0,066	-0,653	-0,079	-1,013	-0,789	0,006	0,372
AASPLYSSP	-0,021	-0,201	0,156	-0,142	-0,21	-1,313	-1,112	-0,963	-0,039	-0,087	0,281	-1,961
ASPLYSSPL	-0,194	-0,216	0,281	-0,122	-0,23	-0,205	-0,111	0,062	0,22	0,171	0,3	0,618
SPLYSSPLA	-0,188	-0,241	0,091	-0,116	-0,897	0,365	0,512	0,544	-0,64	-0,861	-0,703	0,161
PLYSSPLAL	-1,388	-0,013	0,255	0,155	-0,136	-0,511	-0,982	-0,359	0,088	0,234	-0,533	-0,334
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
IDAWAASPL	-0,001	0,763	0,361	0,521	-0,352	0,16	0,493	-0,041	0,571	0,845	0,649	
DAWAASPLY	0,619	-0,058	0,591	0,134	0,834	1,067	0,797	0,855	1,08	0,564	-0,294	
AWAASPLYS	0,053	-0,496	0,029	-0,683	0,245	-0,22	-0,268	-0,423	-0,543	-0,794	0,012	
WAASPLYSS	0,584	0,401	-0,014	0,421	1,104	-0,21	0,871	0,738	0,087	0,102	0,549	
AASPLYSSP	-1,728	-1,65	-1,624	-1,728	-0,941	-1,914	-2,046	-1,824	-2,153	-1,97	-0,669	
ASPLYSSPL	0,111	0,076	0,118	0,044	-0,711	0,384	0,116	0,101	0,527	0,332	0,331	
SPLYSSPLA	0,329	-0,159	0,321	-0,146	0,061	0,576	0,574	0,349	0,634	0,094	0,027	
PLYSSPLAL	-0,272	-0,583	-0,065	-0,243	0,487	-0,041	0,203	-0,328	-0,834	-0,472	-0,078	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provável ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
VTGMLTGH	0,068	-0,678	0,136	-0,247	-0,209	-0,105	0,044	-0,156	0,369	0,315	0,351	-0,284
TDGMTGHF	-0,075	-0,237	0,054	-0,348	-1,148	0,179	0,301	0,33	0,666	0,544	0,116	0,794
DGMLTGHFS	-0,26	-0,34	-0,073	-0,069	-10,16	-0,376	0,1	-0,03	-0,314	-0,427	0,106	0,223
GMLTGHFSA	-0,154	-0,271	-0,017	-0,367	0,001	0,11	-0,238	-0,104	-0,905	-0,648	-0,541	-0,426
MLTGHFSAL	0,107	-0,099	0,194	0,091	0,011	-0,565	-0,283	-0,503	0,22	0,171	0,373	0,09
LTGHFSALR	0,119	-0,617	0,132	-0,144	0,252	0,162	0,428	0,29	0,356	0,254	0,234	-0,323
TGHFSALRL	-0,054	-0,295	0,356	-10,29	-0,299	0,321	0,554	0,64	0,088	0,234	0,143	1,036
GHFSALRLC	-0,19	-0,222	0,1	0,171	-0,978	0,066	-0,102	-0,079	-0,609	-0,168	-0,404	-0,352
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB11101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
VTGMLTGH	-0,126	-0,053	0,345	0,129	0,17	-0,541	-0,774	-0,411	-0,107	-0,495	0,083	
TDGMTGHF	0,271	0,2	0,528	0,391	0,532	0,795	0,812	0,188	0,86	0,625	0,382	
DGMLTGHFS	-0,336	0,037	-0,519	-0,315	-0,966	0,006	-0,014	0,008	-0,186	-0,221	-0,176	
GMLTGHFSA	0,154	-0,512	-0,035	-0,416	0,354	0,582	0,456	0,355	0,141	-0,242	-0,083	
MLTGHFSAL	-0,298	0,004	0,146	0,283	0,414	-0,086	-0,811	-0,207	-0,064	0,124	0,621	
LTGHFSALR	0,606	0,501	0,157	0,131	-0,291	-0,016	0,048	0,416	0,404	0,646	-0,284	
TGHFSALRL	0,672	0,374	0,537	0,159	0,344	0,658	0,613	0,403	0,909	0,704	0,444	
GHFSALRLC	-0,695	-0,496	-0,715	-0,396	-0,228	-1,021	-0,538	-0,968	-0,968	-0,771	-0,037	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 28. Peptideo CVILLTVTDGMLTG avaliado em servidor EpiDOCK server para identificação de ligantes de alelos de HLA. Resultados positivos (iguais ou maiores que os pré estabelecidos na pontuação de cada alelo – quadrados em amarelo) significa uma provavel ligação do peptídeo selecionado aos alelos previstos para uma possível ligação as moléculas de MHC de classe II.

Sequência	DPA1*0103/ DPB1*0201	DPA1*0103/ DPB1*0401	DPA1*0103/ DPB1*0402	DPA1*0201/ DPB1*0101	DAP1*0201/ DPB1*0501	DQA1*0101/ DQB1*0501	DQA1*0102/ DQB1*0602	DQA1*0301/ DQB1*0302	DQA1*0401/ DQB1*0402	DQA1*0501/ DQB1*0201	DQA1*0501/ DQB1*0301	DRB1*0101
Os fichários tem pontuação acima ou igual ao limite fornecido nesta linha.	0,1	0	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3
CVILLTVT	0,041	-0,146	0,057	-0,443	-0,795	-0,046	0,091	0,121	-0,068	-0,061	0,313	0,156
VILLTVTD	-0,006	-0,091	0,15	0,084	-0,262	-0,134	0,121	0,116	-0,098	-0,001	0,233	0,418
ILLTVTDG	0,156	-0,045	0,086	0,147	-0,406	-0,06	0,26	0,166	-0,238	-0,216	0,315	0,61
LLTVTDGM	0,131	-0,04	0,209	-0,028	0,087	0,031	0,191	0,052	0,476	0,355	0,258	0,415
LLTVTDGML	0,044	-0,04	0,235	-0,466	-0,531	-0,169	0,083	-0,016	0,091	0,069	0,082	0,304
LTVTDGMLT	0,121	-0,617	0,201	-0,101	-0,009	-0,211	0,081	-0,094	-0,026	-0,062	0,252	0,272
TVTDGMTG	-0,008	-0,202	0,109	-0,258	-0,011	0,121	0,205	0,062	-0,337	-0,181	0,154	0,063
	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1201	DRB1*1302	DRB1*1501	
	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,3	0,2	
CVILLTVT	-0,216	0,04	-0,014	-0,165	-0,697	-0,696	0,001	-0,404	-0,014	-0,587	0,154	
VILLTVTD	0,608	0,622	0,563	0,396	-0,272	0,11	0,56	0,962	0,594	0,274	0,016	
ILLTVTDG	0,578	0,607	0,482	0,249	-0,545	-0,053	0,563	0,623	0,683	0,384	0,247	
LLTVTDGM	0,203	0,249	0,546	0,554	0,31	0,357	0,436	0,151	0,418	0,581	0,477	
LLTVTDGML	0,12	-0,002	0,249	0,08	0,677	0,333	0,431	0,042	0,345	0,209	0,628	
LTVTDGMLT	0,479	0,115	0,655	0,294	0,25	0,312	0,771	0,368	0,663	0,241	0,395	
TVTDGMTG	0,603	-0,111	0,288	-0,137	-0,257	0,262	-0,307	0,349	-0,088	0,099	0,042	

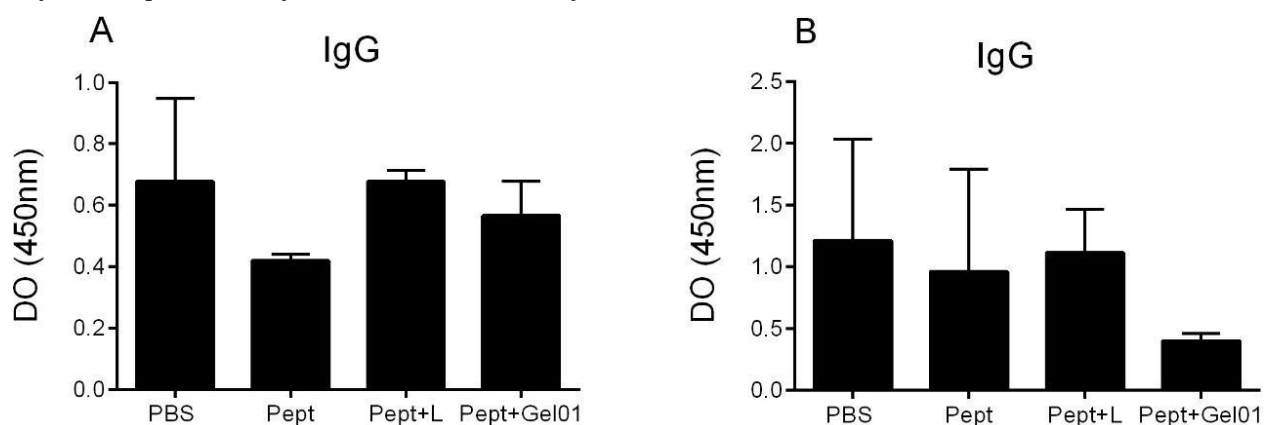
Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Quadro 29. Pesagem de camundongos Balb/c e Swiss dos Grupos 1, 2, 3 e 4 nos dias 0 (início da imunização), 7, 14 (última imunização dos camundongos swiss) e 21 (última imunização dos camundongos Balb/c). Total de peso por grupos de cada uma das pesagens para avaliação de citotoxicidade do imunizante administrado.

Balb/c		Peso (g)				Swiss		Peso (g)		
		Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21			Dia 0	Dia 7	Dia 14
G1	Camundongo 1	28	27	28	30	G1	Camundongo 1	25	27	28
	Camundongo 2	26	27	27	33		Camundongo 2	40	42	42
	Camundongo 3	25	27	28	28		Camundongo 3	35	38	39
	Camundongo 4	27	29	29	30		Camundongo 4	42	48	47
	Camundongo 5	26	26	28	30		Camundongo 5	30	33	32
	Total G1	132	136	140	151		Total G1	172	188	188
G2	Camundongo 1	27	31	31	30	G2	Camundongo 1	40	43	42
	Camundongo 2	24	30	28	31		Camundongo 2	38	38	37
	Camundongo 3	27	30	27	30		Camundongo 3	34	38	36
	Camundongo 4	28	30	26	31		Camundongo 4	33	34	35
	Camundongo 5	27	29	28	29					
	Total G2	133	150	140	151		Total G2	145	153	150
G3	Camundongo 1	27	31	31	31	G3	Camundongo 1	55	58	57
	Camundongo 2	28	27	28	28		Camundongo 2	44	44	46
	Camundongo 3	27	26	27	31		Camundongo 3	45	48	48
	Camundongo 4	30	30	26	32		Camundongo 4	47	48	49
	Camundongo 5	31	28	29	30		Camundongo 5	56	57	55
	Total G3	143	142	141	152		Total G3	247	255	255
G4	Camundongo 1	27	31	29	28	G4	Camundongo 1	44	47	49
	Camundongo 2	26	28	28	29		Camundongo 2	43	45	44
	Camundongo 3	26	26	29	29		Camundongo 3	48	50	49
	Camundongo 4	30	26	30	30		Camundongo 4	44	46	47
	Camundongo 5	27	27	28	29		Camundongo 5	35	38	38
	Total G4	136	138	144	145		Total G4	214	226	227

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Figura 15. Resposta de anticorpos IgG contra GD2102 (A) e GD2202 (B) de *L. infantum*. Cada grupo de camundongo Swiss (n=5) recebeu duas doses da formulação vacinal via subcutânea, com intervalo de 14 dias entre a primeira e a segunda dose. Quatro dias após a terceira dose, o sangue dos animais foi coletado para a obtenção do soro e determinação do título de anticorpo IgG 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⁻¹, pH 9,5) contendo o peptídeo GD2202 (20 µg.mL⁻¹). O resultado representa os valores de absorbância de anticorpos conjugados com HRP (Abcam) e diluição de 1:100 do *pool* de soro de camundongos. Grupos: G1 -PBS (100 µL); G2 - GD2202 com PBS (100 µg/mL); G3 - peptídeo (100 µg) + adjuvante Montanide™ Gel 01 (10% da solução) + PBS; G4 - peptídeo (1 mg) encapsulado em lipossomas. A significância estatística foi determinada por ANOVA usando o teste de comparações múltiplas de Tukey com intervalo de confiança de 95%.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).