

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 22/03/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia



**Identificação, caracterização e síntese peptídica
associada à enolase de *Sporothrix schenckii*: aplicação
em plataforma imunossensora eletroquímica portátil
para o diagnóstico da Esporotricose Felina.**

BRUNA MATEUS DE CASTILHO

Araraquara-SP
2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia



Identificação, caracterização e síntese peptídica associada à enolase de *Sporothrix schenckii*: aplicação em plataforma imunossensora eletroquímica portátil para o diagnóstico da Esporotricose Felina.

Identification, characterization and peptide synthesis associated with *Sporothrix schenckii* enolase: application in a portable electrochemical immunosensor platform for the diagnosis of Feline Sporotrichosis.

Bruna Mateus de Castilho

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, área de Imunologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, para obtenção do título de doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara-SP
2022

C352i Castilho, Bruna Mateus de.
Identificação, caracterização e síntese peptídica associada à enolase de *Sporothrix schenckii*: aplicação em plataforma imunossensora eletroquímica portátil para o diagnóstico da Esporotricose Felina / Bruna Mateus de Castilho. – Araraquara: [S.n.], 2022.
98 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.
Coorientadora: Iracilda Zeppone Carlos.

1. *Sporothrix brasiliensis*. 2. Felinos. 3. Bioinformática. 4. Biossensor. 5. Diagnóstico. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Carlos, Iracilda Zeppone, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Identificação, caracterização e síntese peptídica associada à enolase de *Sporothrix schenckii*: aplicação em plataforma imunossensora eletroquímica portátil para o diagnóstico da esporotricose felina.

AUTORA: BRUNA MATEUS DE CASTILHO

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO INÁCIO DA COSTA

COORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a IRACILDA ZEPPONE CARLOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em **BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA**, área: Imunologia pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa (Participação Virtual)

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-Unesp), Araraquara.

Prof. Dr. Sandro Antônio Pereira (Participação Virtual)

Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro.

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior (Participação Virtual)

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-Unesp), Botucatu.

Prof. Dr. Ana Marisa Fusco de Almeida (Participação Virtual)

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-Unesp), Araraquara.

Araraquara, 22 de março 2022.

ESSA TESE FOI DESENVOLVIDA:

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus Araraquara, São Paulo, Brasil.

LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CLÍNICA E BIOLOGIA MOLECULAR,
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS.

PARCERIAS

Dr. Deivys Leandro Fuentes Portuondo
Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, FCF-UNESP.

Prof. Dr. Sandro Antônio Pereira
FIOCRUZ - RJ

Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos
Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Fármacos e Medicamentos,
FCF-UNESP.

Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida
Núcleo de Proteômica, Departamento de Análises Clínicas, FCF-UNESP.

Dr. Paulo César Gomes
Núcleo de Proteômica, Departamento de Análises Clínicas, FCF-UNESP.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais, Lúcia e João
e meu irmão Rodolpho.
Aos meus estimáveis Antônio e Aparecida.
Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa.
A minha fiel amiga Cássia.
A minha numerosa família MATEUS & CASTILHO,
meus tios e primos, este título dedico a vocês.*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, na *Santíssima Trindade*, a *Virgem Maria*, ao meu *Anjo* e *Santos* de devoção,

Se cheguei até aqui, foi porque Deus permitiu. Me sustentou em todo o caminho, colocou pessoas maravilhosas em minha vida, me inspirou pelo Espírito Santo, me deu sua mãe, como minha amada mãe, *Nossa Senhora Aparecida*, Rainha, Protetora, Intercessora e Medianeira de todas as Graças, que incontáveis vezes rogou por mim junto a Jesus, meu Salvador.

Aos Santos de minha devoção, agradeço a cada intercessão neste período a *Santa Rita de Cássia*, *Santa Luzia*, *Santa Gemma Galgani*, *São Benedito*, *São José*, *São Lucas*, *São Paulo*, *São João Paulo II* e Beato *Carlo Acutis*.

Ao **Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa**,

Meus eternos agradecimentos, desde o momento que me aceitou como sua aluna de doutorado aos dias atuais, e antecipadamente pelos dias que virão. Profissional íntegro, honesto, batalhador, perseverante, sempre disposto a ajudar o próximo, cuida de nós, seus alunos, como se fossemos seus filhos. Agradeço, especialmente, pela infinita paciência, compreensão e apoio que teve comigo neste período, esta conduta foi fundamental para que eu não desistisse, adoecesse e continuasse seguindo em frente. Por toda confiança depositada em mim, por me fazer acreditar que em pouco tempo conseguiríamos fazer um excelente trabalho e assim fizemos. O Senhor, sem dúvidas, foi o melhor orientador que eu poderia ter. E essa VITÓRIA, é NOSSA!!

A **Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos**,

Minha coorientadora, agradeço pela confiança e por permitir que eu seguisse em sua linha de pesquisa.

Ao **Dr. Deivys Leandro Fuentes Portuondo**,

Pela parceria, paciência em esclarecer minhas dúvidas e ensinar, e por toda disposição em me ajudar.

A todos do **Laboratório de Imunologia Clínica**, *Marisa*, *Thaís*, *Damiana* e *Alexander*, foi uma honra conhecê-los e aprender com vocês.

Ao **LICBM - Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular**,

Neste agradecimento é impossível conter a emoção, a melhor equipe que já trabalhei, conseguimos de fato formar uma família.

Começo agradecendo ao **Rafael Bianchini Fulindi**, meu primeiro amigo do LICBM, meu parceiro de diversos momentos. Quantas risadas, atrapalhadas e momentos engraçados, nós vivemos. A **Lorrane Davi Brito**, nossa Lô, sou muito grata por todos momentos que tivemos, em especial, por me convidar para morar com você, foi uma mudança brusca no meu estilo de vida, e repentina, mas sem dúvidas, meu período mais feliz, e parte dessa felicidade foi pelo acolhimento que tive por você. Ao **Anderson Amendola Pinheiro** pela enorme contribuição neste trabalho. Anderson, você é brilhante, e certamente, terá um futuro grandioso pela frente. A **Nicolý Simões de Melo**, pela ajuda enquanto IC, e a **Anna Carolina Toledo Borges**, pela ajuda, pela hospedagem em vários momentos, pelas conversas, mas sem dúvidas por todo momento com você serem engraçados e de muitas risadas. Com certeza Anna, nos divertimos muito. A **Aline Reis**, agradeço por se preocupar e manter nosso ambiente de trabalho muito bem organizado, tenho certeza que cientificamente virão muitas contribuições de você.

A **Elisandra e Rualdo**, pela amizade e disposição. Ao **Felipe**, pela paciência em ensinar e ajuda com os *Softwares*. E a **Eloise**, pela amizade repleta de bom humor e companheirismo.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos por cada momento juntos, pelo apoio, motivação, amizade e por todas contribuições.

A **Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP**, como instituição, pelo acolhimento, e aos seus funcionários, em geral. A **Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini**, uma mulher inspiradora e fabulosa, agradeço as oportunidades concedidas, apoio e confiança durante o doutorado. A **Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida**, agradeço por se preocupar e estar à disposição, por todas contribuições neste trabalho, e por aceitar meu convite na qualificação e defesa. Ao **Dr. Paulo César Gomes**, pelas valiosas contribuições. Ao **Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira**, nos anos iniciais, o que seria de mim sem sua ajuda. Aproveitando, estendo os meus agradecimentos a sua equipe, em especial, a **Bruna Cardinali Lustri**, a **Fernanda Zani Manieri** e a **Tamara Machado**. Ao **Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos**, por concretizar meu desejo de aprender e com paciência me ensinar sobre HPLC. A **Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin**, por permitir o uso de equipamentos, e a sua ex-aluna e minha amiga **Dra. Bruna Lallo da Silva**. A **Profa. Dra. Taís Maria Bauab**, pela confiança e carinho. E a **Profa. Dra. Patrícia de Carvalho Mastroianni**, pela amizade, incentivo e torcida, seguimos treinando para o caminho da fé. Ao **Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos**, pela disponibilidade e

colaboração. A **Profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina**, pela disponibilidade, colaboração e ensinamentos.

As funcionárias da **Seção Técnica de pós-Graduação**, **Claudia Molina**, **Aniele Vilella**, **Daniela Tita Altieri** e **Denise Daré Hatanaka**, a vocês minha gratidão, por todos esses anos, por estarem disponíveis, pelos conselhos e por me ouvirem pacientemente em muitos momentos. A nossa secretária do **Departamento de Análises Clínicas**, **Cristina de Fátima Maria**. Aos funcionários da Biblioteca-FCF, por todo auxílio. Aos funcionários terceirizados que zelam pela nossa limpeza, em especial, a **Samira**, e os que zelam por nossa segurança, em especial a **Viviane**, o **Sr. Paulo** e o **Leandro**.

Recebam meu carinho, respeito e admiração!!

Agradeço ao **Prof. Dr. Sandro Antônio Pereira**, pela valiosa contribuição em minha qualificação, por sua presença em minha defesa e pela doação de amostras.

Ao **Prof. Dr. João Araújo Pessoa Júnior**, agradeço pela doação de amostras e pela participar da minha defesa.

Ao Ministério da Educação e a CAPES pelo financiamento desse estudo que me possibilitou dedicação exclusiva durante esse período.

Saindo do âmbito institucional e acadêmico, agradeço à minhas amigas **Rhayane Margutti** e **Clécia Andrade**, das coisas boas que me aconteceram nos últimos anos, conhecer vocês, sem dúvidas estão entre as melhores. Dividir apartamento com vocês nos últimos meses foi divertidíssimo.

A minha amiga de longa data **Karina Oliveira**, vivendo há anos na França, nunca se esquece de mim, e a cada país novo que conhece, me envia novos postais.

A minha amiga **Lidiane Siqueira**, presente nos melhores momentos de minha vida, mesmo morando distante, mantemos viva nossa amizade.

Minha amiga **Cássia Oliveira**, a quem também dedico esse trabalho, pelos anos de amizade, por ser para mim exemplo de disciplina e perseverança, por ser a primeira pessoa que eu recorro nas mais diversas situações, por abrir as portas de sua casa sem hesitar, e especialmente, pelo trabalho voluntário que você realiza diariamente, com fidelidade admirável, cuidando dos gatos sem lar.

A minhas amigas, **Diamila Furlanetto**, **Rafaela Bevilacqua** e **Luciane Cioffi**. A **Carolina Manzato**, da faculdade ao nosso reencontro em 2021, e a **Mariana Rosa**. Aos meus amados **Eduardo Miranda** e **Patrícia Vieira**, com nossas alegrias **Yasmin** e **Isis**. Vocês foram meu suporte nesse período, minha fortaleza diária. As meninas do “Quarteto” me acompanharam desde o início dessa jornada. Os demais chegaram na hora

exata, nos momentos mais difíceis, me trazendo ânimo, tornando a minha caminhada mais leve. Obrigada pela presença, por desejarem estar comigo, pelo cuidado.

A minha prima **Damires Helena**, presente nos bastidores de toda minha vida acadêmica, da graduação aos dias atuais, embarcou comigo em muitas aventuras, juntas colecionamos momentos únicos. Na minha vida pessoal, é amiga e irmã, muito amada por mim.

Aos meus padrinhos, que eu carinhosamente os chamo de **Sr. Antônio** e **D. Cida**. Agradeço por todas orações, por me instruir por bons caminhos, aconselhar e ensinar. Sou honrada por conhecê-los e agradecida a Deus a todo momento por tê-los em minha vida.

Finalizo agradecendo aos meus pais, **Lucia & João Castilho** e meu irmão **Rodolpho Castilho** pelo suporte financeiro e de apoio, cuidados, dedicação e infinito amor.

*"Porque, quando me sinto fraco, então é que sou forte."
Paulo Apóstolo
2 Co 12:10.*

RESUMO

CASTILHO, Bruna Mateus de. **Identificação, Caracterização e Síntese Peptídica associada à Enolase de *Sporothrix schenckii*: Aplicação em Plataforma Imunossensora Eletroquímica Portátil para o Diagnóstico da Esporotricose Felina.** Orientador: Paulo Inácio da Costa. 2022. 98 f. Tese (Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, São Paulo, 2022.

A esporotricose é uma infecção causada por fungos de espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix*, afetando humanos e animais. Esta infecção apresenta ampla distribuição mundial, mas no Brasil é considerada emergente e representa importante agravo à saúde humana e animal. O diagnóstico laboratorial precoce e com maior acurácia torna-se imprescindível como medida epidemiológica de controle de novas infecções e disseminação da doença nas populações humana e animal. Para medidas de controle eficazes é fundamental métodos de diagnóstico acurados e precoces. Nesse contexto, com grande potencial para aplicação em diagnósticos, os imunossensores eletroquímicos são vistos como ferramentas inovadoras. Assim, o objetivo desta tese foi desenvolver uma plataforma imunodiagnóstica a partir da proteína enolase do *Sporothrix schenckii* (EnoSs), usando sensor eletroquímico, para o diagnóstico da esporotricose felina. Com base em estudos prévios sobre o potencial imunogênico da proteína recombinante enolase do *Sporothrix schenckii* (rSsEno), determinamos a imunorreatividade da rSsEno frente a amostras de soros de gatos positivos (n=20) e negativos (n=6) para esporotricose, aplicando o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). A SsEno demonstrou atividade com concentrações de 1µg. A partir desses resultados com a rSsEno, propomos o emprego deste antígeno em um novo método sorológico para esporotricose. A predição de epítomos mais imunogênicos e antigênicos da EnoSs em célula B foi realizada com o propósito de diminuir possíveis reações inespecíficas da proteína recombinante em plataforma mais sensível baseada em sensor eletroquímico. Os servidores *web* de predição utilizados foram: BEPIpred 2.0, DLBEtope, IBCEL-EL e Lbtope. O melhor epítomo da EnoSs obtido foi sintetizado por Síntese Química em Fase Sólida usando a estratégia Fmoc/tBut, posteriormente caracterizado por Espectrometria de Massas ms/ms e analisado e purificado por HPLC. A plataforma diagnóstica com sensor eletroquímico foi desenvolvida empregando o sensor DRP-220AT da Metrohm/DropSens, pela imobilização do peptídeo em monocamada organizada, sobre o eletrodo de trabalho, com cistamina (20 mM) e glutaraldeído (5 mM). As reações imunoquímicas ocorreram com os soros positivos e negativos previamente analisados pelo método de ELISA, observando redução da corrente entre 0 e - 0,5 mA e com o Potencial/V entre 0,0 e 0,15V da transdução do sinal eletroquímico. A plataforma eletroquímica desenvolvida é promissora como novo método imunodiagnóstico para a esporotricose felina.

Palavras-chave: *Sporothrix brasiliensis*. Felinos. Bioinformática. Biossensor. Diagnóstico.

ABSTRACT

CASTILHO, Bruna Mateus de. **Identification, Characterization and Peptide Synthesis Associated with *Sporothrix schenckii* Enolase: Application in a Portable Electrochemical Immunosensor Platform for the Diagnosis of Feline Sporotrichosis.** Orientador: Paulo Inácio da Costa. 2022. 98 f. Tese (Biosciences and Biotechnology Applied to Pharmacy) - School of Pharmaceutical Science, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, São Paulo, 2022.

Sporotrichosis is an infection caused by fungi of species belonging to the genus *Sporothrix*, affecting humans and animals. This infection has a worldwide distribution, but in Brazil it's considered emerging and represents an important threat to human and animal health. Early and more accurate laboratory diagnosis is essential as an epidemiological measure to control new infections and the spread of the disease in humans and animals. For effective control measures we need accurate and early diagnostic methods. In this context, with great potential for application in diagnostics, electrochemical immunosensors are seen as innovative tools. The aim of this thesis was to develop an immunodiagnostic platform from the *Sporothrix schenckii* protein enolase (EnoSs), using an electrochemical sensor, for the diagnosis of feline sporotrichosis. Based on previous studies on the immunogenic potential of the recombinant protein enolase from *Sporothrix schenckii* (rSsEno), we determined the immunoreactivity of rSsEno against sera samples from positive (n=20) and negative (n=6) sporotrichosis cats, applying the indirect enzyme immunoassay (ELISA). SsEno demonstrated activity at concentrations of 1 μ g. From these results with rSsEno, we propose the use of this antigen in a new serological method for sporotrichosis. The prediction of more immunogenic and antigenic epitopes of EnoSs in B cells was performed with the purpose of reducing possible nonspecific reactions of the recombinant protein in a more sensitive platform based on an electrochemical sensor. The prediction web servers used were: BEPIpred 2.0, DLBEtope, IBCEL-EL and Lbtope. The best epitope of EnoSs obtained was synthesized by Solid Phase Chemical Synthesis using the Fmoc/tBut strategy, later characterized by Mass Spectrometry ms/ms and analyzed and purified by HPLC. The diagnostic platform with an electrochemical sensor was developed using the Metrohm/DropSens DRP-220AT sensor, by immobilizing the peptide in an organized monolayer, on the working electrode, with cystamine (20 mM) and glutaraldehyde (5 mM). The immunochemical reactions occurred with the positive and negative sera previously analyzed by the ELISA method, observing a reduction in the current between 0 and - 0.5 mA and with the Potential/V between 0.0 and 0.15V of the electrochemical signal transduction. The electrochemical platform developed is promising as a new immunodiagnostic method for feline sporotrichosis.

Keywords: *Sporothrix brasiliensis*. Felines. Bioinformatics. Biosensor. Diagnosis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

µL	microlitro
µm	micrometro
Å	Angstrom
D. O.	Densidade Óptica
Da	Dalton
IgG	Imunoglobulinas G
Kd	Constante de dissociação
Kd	Kilodalton
MM	Massa Molecular
mM	Milimolar
°C	Graus Celsius
2PG	2-fosfoglicerato
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
ATP	adenosina trifosfato
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCM	Diclorometano
DIC	diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N Dimetilformamida
DOTA	2,2' - (Etilenodioxi) dietil etiol
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EnoSs	<i>Enolase do Sporothrix Schenckii</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ESI-MS¹	Espectro de Massa/Carga do Peptídeo
FCF-Unesp	Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonila
GMS	<i>Grocott Methenamine Silver</i>
H₂CO₃	Tampão carbonato
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico

HBTU	N, N, N', N'-tetrametil O-(1H-benzotriazol-1-il)urônio
HCTU	O-(1H-6-Colorobenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluroniu hexafluorofosfato
HF anidro	Ácido Fluorídrico anidro
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBB	Instituto de Biociências de Botucatu
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
<i>L. brasiliensis</i>	<i>Leishmania brasiliensis</i>
Lapclin-Dermzoo	Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
LDMVet	Laboratório de Diagnóstico Molecular Veterinário
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
mA	Mili Ampère
nA	Nano Ampère
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEP	Fosfoenolpiruvato
PESs01	Peptídeo obtido da predição de célula B da enolase <i>S. schenckii</i>
Rink Amida	Ácido 4-(2'-4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacético
rSsEno	proteína recombinante enolase do <i>S. schenckii</i>
RT-qPCR	<i>Polymerase Chain Reaction, Real Time</i>
SAM	<i>Self-Assembled Monolayer</i>
<i>S. brasiliensis</i>	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
<i>S. chilensis</i>	<i>Sporothrix chilensis</i>
<i>S. globosa</i>	<i>Sporothrix globosa</i>
<i>S. luriei</i>	<i>Sporothrix luriei</i>
<i>S. Mexicana</i>	<i>Sporothrix mexicana</i>
<i>S. schenckii</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
SsCBF	Fração de ligação da concanavalina A do <i>S. schenckii</i>

TBTU	tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il) 1,1,3,3-tetrametilurônio
tBut	terc-butila
TFA	Ácido Trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
V	Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Histórico de Esporotricose	19
1.2 Aspectos Epidemiológicos	20
1.3 Espécies <i>Sporothrix</i>	22
1.4 Esporotricose Felina	26
1.5 Diagnóstico para esporotricose felina.....	28
1.6 Proteínas <i>Sporothrix Schenkii</i>	31
1.7 Peptídeos Antigênicos	31
1.8 Síntese Química de Peptídeos	34
1.8.1 Purificação de peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	39
1.8.2 Espectrometria de Massas.....	40
1.9 Imunossensores Eletroquímicos.....	41
6. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico de Esporotricose

O fungo *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) foi descrito pela primeira vez, em 1898, por Benjamin Schenck, no Hospital Johns Hopkins, em Baltimore, Maryland, Estados Unidos. Benjamin Schenck descreveu precisamente as características morfológicas, o método e resultados da inoculação, e posteriormente foram estudadas pelo micologista Erwin Smith, que concluiu pelas características fenotípicas que o fungo pertencia ao gênero *Sporotrichum* (CARLOS & BATISTA-DUHARTE, 2015; RODRIGUES et al., 2020). Dois anos depois, Hektoen e Perkins também isolaram esse agente etiológico de lesões cutâneas de outros dois pacientes e por meio de estudos morfológicos propuseram o gênero *Sporothrix*, divisão Ascomycota e ordem Ophiostomatales, sendo o *S. schenckii* a espécie de maior importância patogênica da ordem (HEKTOEN & PERKINS, 1900; BONIFAZ & VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, 2010).

Os primeiros casos de esporotricose no Brasil foram descritos por Adolfo Lutz e Affonso Splendore, em 1907, após a identificação do *S. schenckii* em humanos e ratos. Lutz e Splendore descreveram que a infecção ocorria de forma natural entre ratos e era transmitida por mordidas de ratos infectados que inoculava o agente etiológico no tecido do hospedeiro (LUTZ et al., 1907).

Conhecida como “doença do Jardineiro de Rosas”, pela forma de infecção através da inoculação traumática do fungo na pele após contato direto com o solo e plantas com a presença do fungo, a esporotricose está associada a profissões relacionadas a agricultura e atividades como jardinagem. Essa associação é feita devido *S. schenckii* e outras espécies do gênero *Sporothrix* habitar a natureza e estar presente no solo, na vegetação, nos troncos de árvores ou madeiras em decomposição, nos espinhos, nos musgos, nas palhas e no feno (BARROS, ALMEIDA & SCHUBACH, 2011; CHAKRABARTI et al., 2015).

Desde sua descoberta nos Estados Unidos, casos de esporotricose humana foram registrados em outros países e aumentaram com o passar dos anos. No ano de 1952, em Nova York, EUA, foi descrito o primeiro caso de transmissão zoonótica envolvendo gatos. Este registro possibilitou a

identificação e descrição do primeiro caso de transmissão zoonótica no Brasil, ocorrido em 1955 (RODRIGUES et al., 2020).

No período entre as décadas de 1950 e 1990, havia predominância nos casos de esporotricose humana. Após identificado o primeiro caso de transmissão zoonótica por gatos, em 1998, no Rio de Janeiro, a doença tornou-se emergente no estado, para esporotricose humana e felina (BARROS et al., 2010a; GREMIÃO et al., 2020).

1.2 Aspectos Epidemiológicos

Os fungos do gênero *Sporothrix* possuem distribuição geográfica mundial, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais com alta temperatura e umidade (BONIFAZ & VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, 2010).

Nas Américas, iniciando pela América do Sul, além do Brasil, há ocorrência principalmente nos países fronteiras Argentina, Paraguai e Uruguai, e relatos na Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, seguindo pela Guatemala, na América Central e México e Estados Unidos, na América do Norte. Na Europa, as principais ocorrências foram na França, na Itália e no Reino Unido, além de relatos na África do Sul, no continente africano e na Ásia, principalmente no Japão, Tailândia, Malásia e China (RODRIGUES et al., 2014; CARLOS & BATISTA-DUHARTE, 2015; CÓDORBA et al., 2018; DUANGKAEW et al., 2018; HAN & KANO, 2020; ROSSOW et al., 2020).

Desde sua descrição inicial, há relatos de esporotricose em diversos países, no entanto, por se tratar de uma doença negligenciada, sem notificação compulsória na maioria dos estados brasileiros e outros países, sua prevalência exata é desconhecida. Sabe-se que as espécies de *Sporothrix* se diferem quanto à distribuição geográfica (CHAKRABARTI et al., 2015; CAVALCANTI et al., 2017).

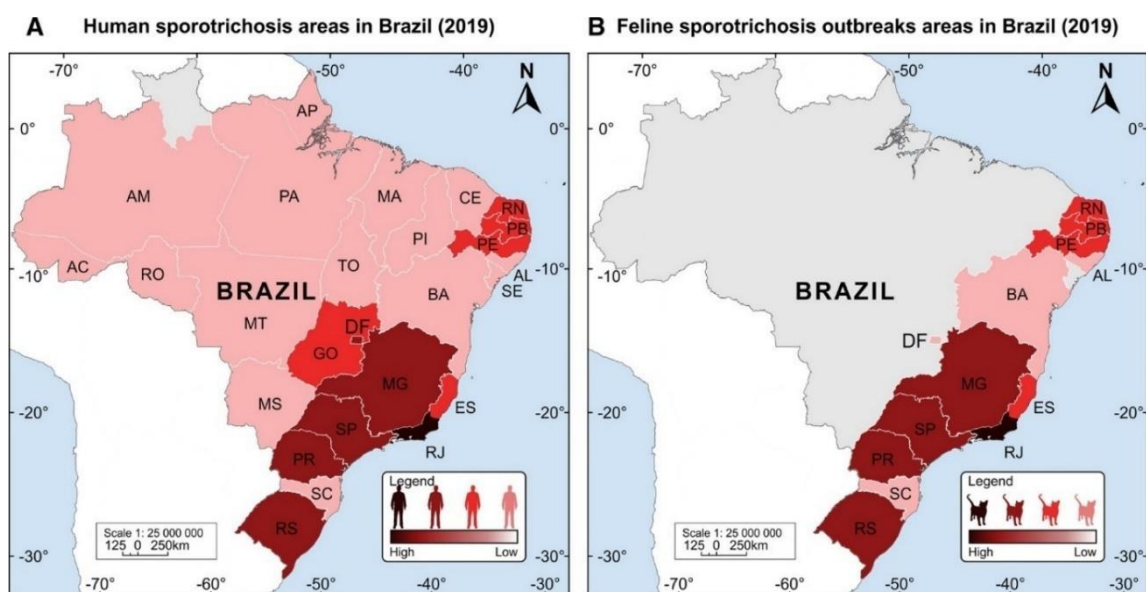
Sporothrix globosa (*S. globosa*) é relatada em vários países com frequência baixa, variando de 5% a 28% em países das Américas, da África e da Europa, sendo 56% das infecções predominante na Ásia (YU et al., 2013). Infecções em humanos por *S. luriei* foram relatadas na África, na Itália e na Índia, e infecções caninas, no Brasil (AJELLO et al., 1969; OLIVEIRA et al., 2011).

De acordo com o número de casos relatados no mundo, desde 1898, há três países em que a esporotricose é endêmica, sendo liderada pelo Brasil, seguidas pela China e África do Sul (ZHANG et al., 2015).

No Brasil, há circulação de várias espécies do gênero *Sporothrix*, principalmente as espécies patogênicas, no entanto, *Sporothrix brasiliensis* (*S. brasiliensis*) é a espécie emergente e a principal espécie associada a transmissão zoonótica (RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; GREMIÃO et al., 2021).

Dados epidemiológicos observados no período de 1998 a 2019 mostram Rio de Janeiro, seguidos de São Paulo, Paraná, Espírito Santo e Rio Grande do Sul possuem alta prevalência para esporotricose humana. Na figura 1, é possível observar a frequência e expansão dos casos de esporotricose no país (RODRIGUES et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021).

Figura 1. Expansão do número de casos de esporotricose humana e felina entre 1998 e 2019.



Referência: Rodrigues et al., 2020. DOI:10.1007/s11046-020-00425-0

O estado do Rio de Janeiro atualmente é endêmico para esporotricose felina. Seguido do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo são outras regiões do país com aumento alarmante no número de casos. Recentemente, surtos de esporotricose felina foram registrados no Recife, em 2018, na Paraíba, em 2019 e 2021 e no Rio Grande do Norte, em 2020. Também foram relatados aumento no número de casos nos

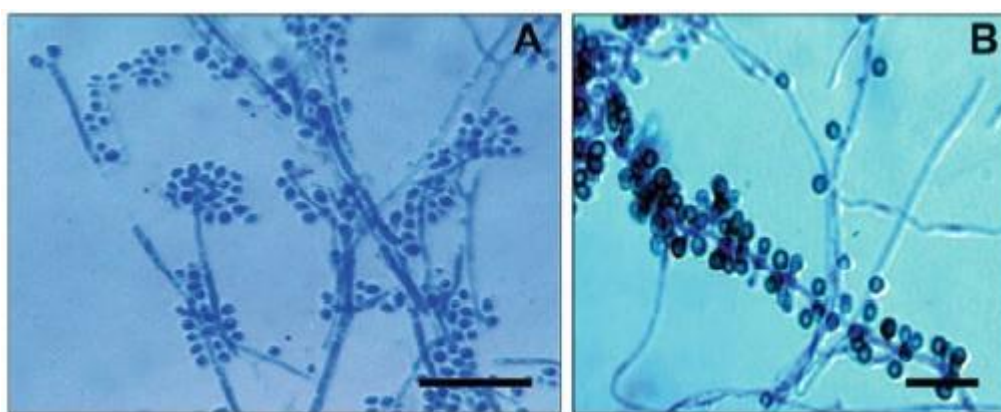
estados de Santa Catarina, Bahia, Alagoas e Distrito Federal (BARROS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016; GONZALES et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020; GREMIÃO et al., 2020; GREMIÃO et al., 2021).

1.3 Espécies *Sporothrix*

As espécies do gênero *Sporothrix* pertencem ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae (GUARRO, GENÉ & STCHIGEL, 1999; ROMEO & CRISEO, 2013; RODRIGUES et al., 2016a; RODRIGUES et al., 2020).

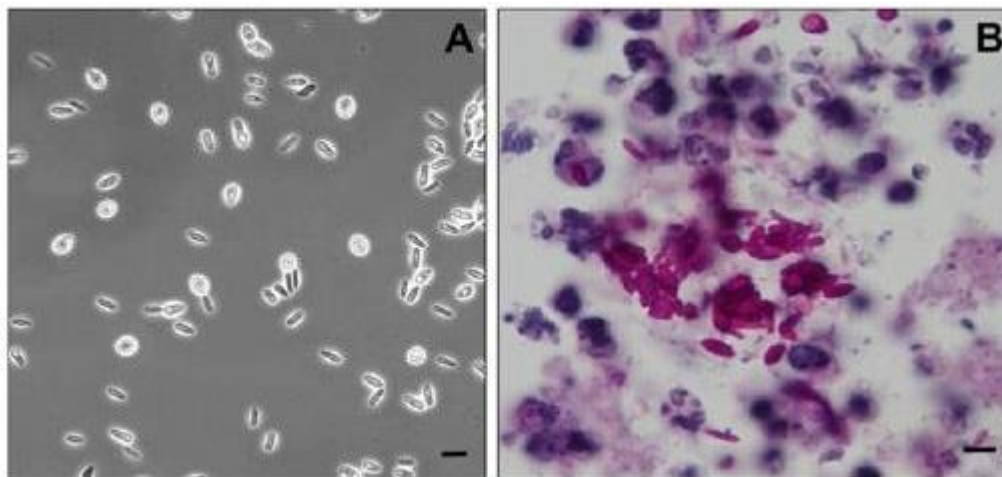
De modo geral, as espécies do gênero *Sporothrix* são fungos dimórficos que em vida saprofítica ou cultivados em ágar Sabouraud a 25°C, apresentam forma filamentosa, com hifas delgadas, septadas e ramificadas com 1 a 2 µm de diâmetro e aglomerados de conídios, em forma de margarida ou crisântemo, indicada pela figura 2 (BARROS et al., 2011). Em parasitismo ou quando cultivado a 37°C em meios ricos, tais como ágar infusão cérebro-coração, cresce como levedura unicelular ovalada, globosa e em forma de charuto, com 2 a 6 µm de diâmetro podendo apresentar um ou mais brotamentos, conforme a figura 3 (LOPES-BEZERRA et al., 2006; BARROS et al., 2011).

Figura 2. Morfotipo micelial de *Sporothrix schenckii* EH-143. (A) Hifas hialinas, septadas, finas, com conídios simpodiais. (B) Conídios sésseis castanho-escuros de paredes espessas ao longo dos lados da hifa. Barra = 10 µm.



Referência: CARLOS & BATISTA-DUHARTE, 2015.

Figura 3. Morfotipo de levedura *Sporothrix schenckii* EH-143. (A) Células em brotamento de levedura a 37 °C em YPG (extrato de levedura-peptona-glicose). (B) Células de levedura únicas (corpos de charuto) dentro de macrófagos e neutrófilos, mas abundantes células de levedura PAS-positivas são observadas dentro de uma célula de espuma em Camundongos infectados com *S. schenckii* EH-143 em 8 semanas de infecção. Barra = 10 µm.



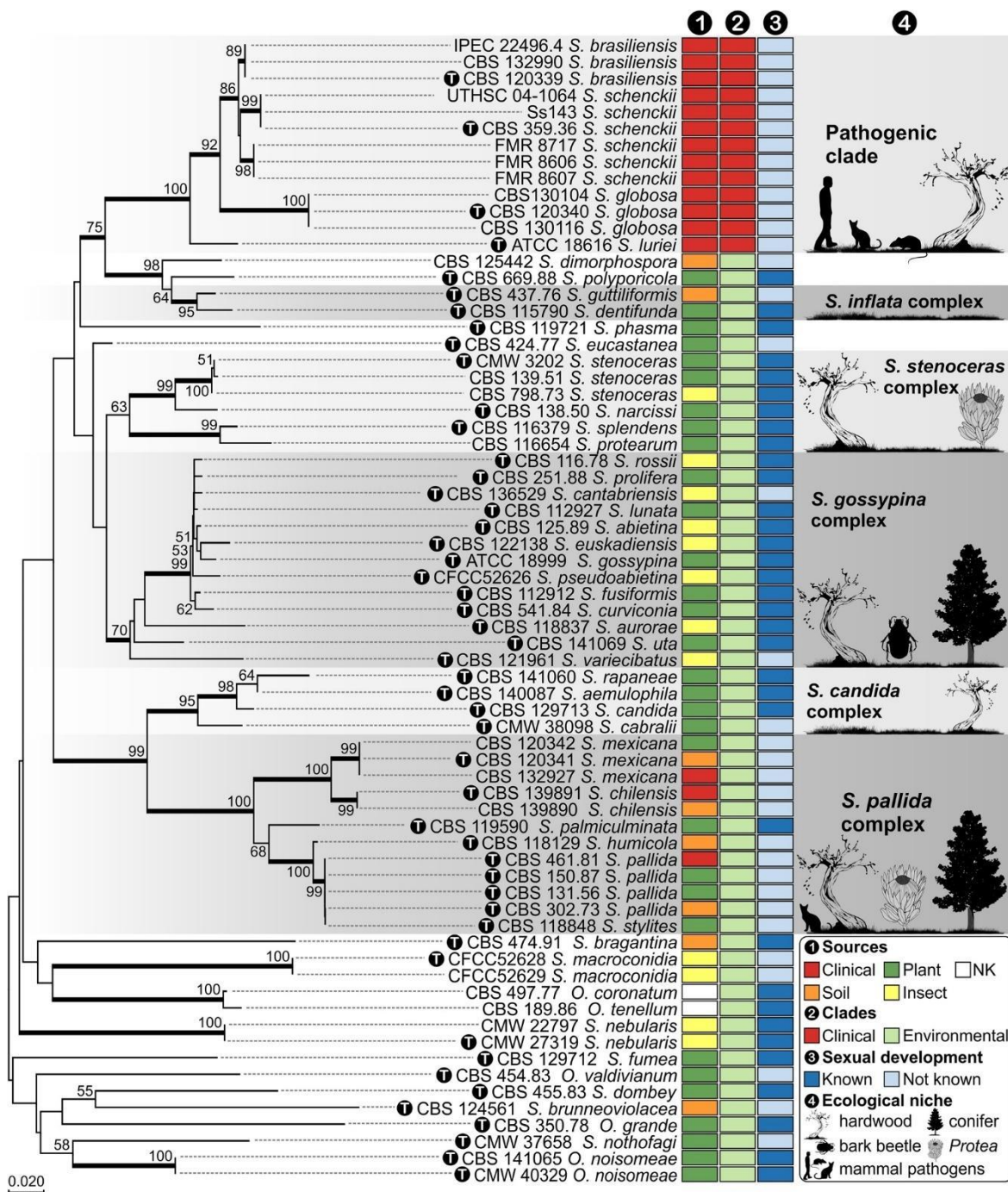
Referência: CARLOS & BATISTA-DUHARTE, 2015.

Curiosamente, durante anos pensou-se que *S. schenckii* era o único agente etiológico causador da esporotricose, porém esses conceitos mudaram a partir de 2006, quando uma série de trabalhos publicados por Rita Marimon e colaboradores (2006, 2007 e 2008) sugeriram a existência de novas espécies no gênero *Sporothrix*, causadoras da esporotricose. Esses estudos se basearam no sequenciamento do gene da calmodulina, características nutricionais e fenotípicas de aproximadamente 60 isolados clínicos e ambientais de países da Europa, África e América do Sul, inclusive no Brasil (MARIMON et al., 2006). Assim *S. schenckii sensu stricto* unido à novas espécies identificadas, como *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix mexicana* (*S. mexicana*) foram reconhecidas como um complexo de espécies crípticas ou complexo *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007). Derivado desses estudos, outras duas espécies também foram identificadas, *Sporothrix luriei* (*S. luriei*) e *Sporothrix pallida* (*S. pallida*) mas não agrupadas dentre do complexo *Sporothrix schenckii* (MARIMON et al; 2008, OLIVEIRA et al., 2014). A terminologia complexo de espécie crípticas é indicada àquelas espécies dentre de um gênero que apesar de suas diferenças genéticas causam manifestações clínicas da doença de maneira similar no hospedeiro (CHAKRABARTI et al., 2015).

As descobertas citadas anteriormente sobre as espécies proporcionaram novos conhecimentos sobre características específicas de cada e associaram a forma com que a esporotricose se manifesta, por exemplo, ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., (2009) realizou um estudo comparativo sobre a patogenicidade experimental do *Sporothrix albicans* (*S. albicans*) unida às quatro espécies clínicas principais do gênero *Sporothrix* e demonstrou que o perfil de virulência de cada uma dessas espécies em camundongos BALB/c era diferente. O *S. brasiliensis* mostrou ser a espécie mais virulenta em termos de mortalidade e carga fúngica nos órgãos acometidos, seguido por *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. albicans*. Em contraste, FERNANDES et al. (2009) encontraram diferenças na secreção de proteínas e imunogenicidade de diferentes isolados pertencentes a *S. schenckii sensu stricto* em relação a *S. brasiliensis* e *S. globosa*.

Revisões recentes demonstraram ao reunir diversos estudos sobre polimorfismo genético e diferenças morfológicas, que as espécies do gênero *Sporothrix* não formam um complexo, mas pertencem à clados. De acordo com a revisão, o gênero *Sporothrix* é formado por 53 espécies, e são divididas em espécies que pertencem ao clado patogênico e espécies que pertencem ao clado ambiental (figura 4). As espécies do clado patogênico, são as espécies de interesse clínico, ou seja, as que causam esporotricose, sendo: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei*. O clado ambiental, por sua vez, é dividido em dois clados, o primeiro é o complexo *S. pallida*, representado por *Sporothrix chilensis* (*S. chilensis*), *Sporothrix mexicana* (*S. mexicana*), *Sporothrix humicola* (*S. humicola*) e *S. pallida*, e pelo segundo, o complexo *Sporothrix stenocera* (*S. stenocera*), compõe as espécies que raramente causam a doença por estarem associadas ao solo, materiais vegetais e em decomposição (RODRIGUES, HOOG & CAMARGO, 2016; RODRIGUES et al., 2016a; RODRIGUES et al., 2020).

Figura 4. Relação Filogenética entre as espécies do gênero *Sporothrix* que compõe o clado clínico e o clado ambiental, com base no sequenciamento da calmodulina.



Referência: Rodrigues et al., 2020. DOI: 10.1007/s11046-020-00425-0

No Brasil, geralmente mulheres, com idade adulta, do lar ou que exercem atividades domésticas, são as mais acometidas pela doença. Atribui a esse perfil epidemiológico o fato dessas mulheres passarem mais tempo em casa, e

consequentemente, terem contato mais próximo com gatos (BARROS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2021). A esporotricose humana manifesta-se clinicamente por uma das quatro formas a seguir, conforme sua classificação: 1) Cutânea Fixa ou Localizada: neste caso a manifestação é restrita a pele e caracterizada por uma única lesão na forma de nódulo avermelhado, recoberto por crostas ou no formato de úlcera, podendo ter discreto comprometimento dos vasos linfáticos. Essa forma também atinge mucosas, como boca e olhos. 2) Cutânea Linfática ou Linfocutânea: é a forma clínica mais frequente da esporotricose. Inicialmente, a lesão aparece na forma de nódulo e evolui em tamanho, adquirindo aspecto ulceroso com exsudato, e forma um cordão endurecido que segue pelo vaso linfático. 3) Cutânea Disseminada: essa forma ocorre principalmente em pacientes imunocomprometidos, e é caracterizada pela formação de múltiplas lesões ulceradas ou verrucosas, espalhadas pela pele. E 4) Forma Extracutânea: de ocorrência rara e difícil diagnóstico, essa forma se manifesta quando há inalação dos conídios ou disseminação por via hematogênica do fungo e atinge os órgãos como pulmões, ossos e fígados, comprometendo suas funções. (FREITAS et al., 2015; OROFINO-COSTA et al., 2017; RAMOS et al., 2021).

O tratamento da esporotricose humana é feito com medicamentos antifúngicos, o itraconazol é o de primeira escolha, pelos resultados eficazes apresentados, associados a antibióticos, como cloranfenicol, e imunomoduladores, como β -glucana, nos casos mais graves (GUTERREZ et al., 2014).

1.4 Esporotricose Felina

Além de humanos, a esporotricose já foi descrita em várias espécies de animais, no entanto, os gatos são os animais mais acometidos e de maior importância epidemiológica, seguido pelos cachorros, estes de menor importância epidemiológica até o momento, porém frequentemente monitorados por serem animais domésticos. Cerca de 96% dos casos de esporotricose felina são causados pela espécie *S. brasiliensis*, a espécie mais virulenta do clado clínico (SCHUBACH et al., 2004; CASTRO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; GREMIÃO et al., 2015).

Enquanto as espécies *S. schenckii* e *S. globosa* são transmitidas por via sapronótica, ou seja, pelo contato direto com o habitat natural desses fungos,

como solo e plantas, o *S. brasiliensis* nunca foi observado nas plantas como fonte de infecção, sendo os gatos responsáveis pela transmissão para outros gatos e humanos (TÉLLEZ-MARTÍNEZ et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016). RODRIGUES et al. (2014a), após encontrar uma estrutura clonal na fase inicial da expansão da epidemia gato-humano no sudeste do Brasil, sugere que houve uma mudança de habitat de *S. brasiliensis* de planta para gato, sendo esse o fator principal para o surgimento da epidemia de *S. brasiliensis* por transmissão zoonótica, desvinculando a ocorrência da doença à ocupação profissional.

Sporothrix brasiliensis está associado a epizootias e zoonoses, e o gato desempenha papel central na transmissão para outros gatos, cachorros, ratos e humanos (RODRIGUES et al., 2016; SANCHOTENE et al., 2015).

A transmissão zoonótica do *S. brasiliensis* era restrita ao Brasil, mas recentemente, foram relatados casos de transmissão zoonótica na Argentina (ETCHECOPAZ, et al., 2020).

No gato, as infecções começam após inoculação traumática do fungo através de lesões, adquiridos habitualmente pelo contato com outros animais infectados, pelo comportamento de gatos serem animais domésticos e possuírem o costume de sair pelas ruas e se envolverem em brigas com outros gatos e cachorros ou em contato direto com solo ou casca de árvores, por outros hábitos comuns dos gatos, de enterrar as fezes no solo e de arranhar superfícies e troncos para subir em árvores. Após a infecção, o fungo deixa de apresentar morfologia filamentosa e adquire morfologia de levedura nos hospedeiros. Um dos mecanismos sugeridos para adaptação do *S. brasiliensis* aos gatos, é o fato do *S. brasiliensis* ser termotolerante e os gatos possuírem elevada temperatura corporal, 39 °C. As leveduras são encontradas em abundância nos tecidos lesionados, nas unhas e na cavidade oral. O hábito dos gatos se lamberem contribuem para a disseminação do fungo para outros tecidos e mucosas (TÉLLEZ-MARTÍNEZ et al., 2014; ALMEIDA-PAES et al., 2015; CARLOS & BATISTA-DUHARTE, 2015)

O perfil dos gatos acometidos pela esporotricose são em sua maioria gatos domésticos, machos, mestiços e não castrados (PEREIRA et al., 2014; MACÊDO-LOPES et al., 2018). E diferente da esporotricose humana, onde a infecção é classificada conforme as manifestações clínicas, nos gatos a

classificação dos sinais clínicos torna-se difícil pelo fato de frequentemente elas se apresentarem de forma simultânea (SILVA et al., 2022). As lesões mais frequentes são nas mucosas, olhos e boca, e cutâneas, principalmente nas patas e orelhas, nas formas de fístulas ou úlceras, com alopecia no local e liberando exsudato sanguinolento. Fortemente acometidos pela esporotricose felina, as lesões provocadas pela infecção são visíveis, os gatos ficam notavelmente debilitados, sendo com frequência fatal (LLORET et al., 2013; MACÊDO-SALES et al., 2018a).

Nos felinos, o tratamento medicamentoso com antifúngicos, sendo o itraconazol de primeira escolha e o cetoconazol como segunda opção, associado a iodeto de potássio demonstraram ser eficazes, no entanto, além de precisar administrar os medicamentos corretamente por meses, dificultando a adesão e consequentemente acarretando em falhas terapêuticas, há necessidade de isolar o gato infectado (KANO et al., 2005). Quando não há possibilidades de tratamento, é recomendada eutanásia e cremação (ROCHETTE, ENGELEN & VANDEN BOSSCHE, 2003; BARROS et al., 2011).

1.5 Diagnóstico para esporotricose felina

Testes diagnósticos laboratoriais são necessários para confirmação da infecção, em virtude dos sinais clínicos da esporotricose felina serem característicos de infecções fúngicas e similares à outras doenças, como câncer e doenças infecciosas em animais com significativa prevalência no Brasil, por exemplo, a leishmaniose. Outros relevantes motivos que fundamentam a necessidade de testes diagnósticos laboratoriais, é o início do tratamento medicamentoso, que só começa após o diagnóstico laboratorial, e geram dados que contribuem no direcionamento das políticas públicas de saúde e nas ações voltadas ao manejo clínico da doença nos felinos (LARSSON, 2011; RODRÍGUEZ-BRITO et al., 2015)

Atualmente, o padrão de referência para o diagnóstico da esporotricose felina é o teste micológico feito a partir do isolamento do *Sporothrix spp* em meio de cultura. Em amostras obtidas por tecido de biópsia, exsudato ou aspirado de lesões, isola o fungo e observa suas características morfológicas e o dimorfismo (SCHUBACH et al., 2006; GREMIÃO et al., 2021).

A cultura, inicialmente é feita usando os meios ágar Sabourad Dextrose com cloranfenicol ou ágar Mycosel, a 25 °C, por cinco a oito dias, observando o crescimento do fungo filamentoso. Após o crescimento do fungo, é feito a inculação em meio Infusão Cérebro Coração (*Brain Heart Infusion*, BHI, forma como é conhecido este meio rotineiramente), incubado a 37°C, e novamente pelo período de cinco a oito dias é observado se há a conversão da forma filamentosa para forma leveduriforme, e se possuem aspecto cremoso e coloração amarelada, concluindo-se dessa forma o diagnóstico micológico (SCHUBACH et al., 2011).

O isolamento de fungos é um método confiável com 95,2% de sensibilidade e 100% de especificidade (MACÊDO-SALES et al., 2018). Entretanto, há limitações relacionadas a execução do teste micológico como à impossibilidade de execução do procedimento no local de atendimento ambulatorial, necessidade de laboratório com nível de Biossegurança 2, contaminações secundárias e maior tempo, até 30 dias, para a liberação dos resultados (SCHWARTZ, KENYON & THOMPSON, 2016; MACÊDO-SALES et al., 2018; GREMIÃO et al., 2021).

O método usado rotineiramente na medicina veterinária para o diagnóstico da esporotricose felina é o exame citopatológico, também conhecido como citopatologia *imprint* (PEREIRA et al., 2011; MACÊDO-SALES et al., 2018).

Com sensibilidade e especificidade de 78,9% a 84,9% do citopatológico em relação à cultura micológica, a citopatologia *imprint* é considerado um método satisfatório no diagnóstico de esporotricose felina. Os gatos apresentam altas quantidades de leveduras nos tecidos e lesões, tornando fácil a identificação, além disso é de fácil execução, baixo custo e obtenção de resultados rápidos. O princípio da técnica consiste na “impressão” da amostra em uma lâmina de vidro, por isso o nome citopatologia *imprint* ou decalque, seguido de coloração da lâmina, geralmente, por Wright ou Romanowsky, e da análise direta de estruturas fúngicas no microscópio, onde grandes quantidade de estruturas leveduriformes de formato arredondadas, ovaladas ou em charutos são observadas no interior de neutrófilos, macrófagos e no meio extracelular (PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2015; MACÊDO-SALES et al, 2018; ROSSOW et al., 2020).

Exames histopatológicos também são empregados com frequência no diagnóstico preliminar da esporotricose felina. São indicados em casos onde há lesões granulomatosas com granulomas em formação e purulentas, típicas dos felinos, pois nessas lesões há predomínio de macrófagos com leveduras de *Sporothrix spp* em seu interior (PEREIRA et al., 2011).

As amostras para histopatológicos são obtidas de biópsia ou necrópsia. Os tecidos coletados são fixados em formol tamponado a 10% embebidos blocos de cera parafina, micrótomo seccionado a 5 µm de espessura e corados especificamente com Metenamina de Prata de Grocott (GMS, *Grocott Methenamine Silver*) e Ácido Periódico de Schiff (PAS, *Periodic Acid-Schiff*) (MIRANDA et al., 2013).

Nos últimos anos, novas ferramentas diagnósticas para esporotricose felina estão em desenvolvimento, a maioria dos estudos direcionam para métodos sorológicos ou métodos envolvendo a Reação em Cadeia Polimerase em tempo real (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) (GREMIÃO et al., 2020; ROSSOW et al., 2020).

Testes sorológicos desenvolvidos inicialmente para esporotricose humana e posteriormente validado para esporotricose felina usando método por ensaio imunoenzimático (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), foram desenvolvidos a partir da descoberta de um antígeno derivado do *Sporothrix spp*, a fração de ligação da concanavalina A (SsCBF), demonstrando durante a validação sensibilidade satisfatória ao avaliar imunorreatividade em soros de gatos de locais endêmicos, previamente confirmados por outros métodos (PENHA & LOPES-BEZERRA, 2000; FERNANDES et al., 2011; BERNARDES-ENGEMAN et al., 2015). O SsCBF-ELISA também permite a detecção sorológica e quantificação de IgG (BAPTISTA et al., 2020).

Apesar de ainda não ser usado com fins diagnósticos em rotinas, a análise molecular por PCR, é uma importante ferramenta diagnóstica, especialmente por permitir a identificação de espécies pelo uso de *primers* específicos (KANO et al., 2005; RODRIGUES et al 2014; RODRIGUES et al., 2015). RODRIGUES et al., (2014a) desenvolveram um método diagnóstico por amplas variações de PCR, a partir do sequenciamento do gene calmodulina, e identificaram com sucesso espécies do gênero *Sporothrix* a partir amostras clínicas e isoladas de

cultura. Os prováveis motivos do PCR não ser a realidade em rotinas diagnósticas são por exigir aparelhos específicos para análise, reagentes que possuem custo elevado, profissionais especializados e local adequado, especialmente para manipulação da amostra (GREMIÃO et al., 2020).

1.6 Proteínas *Sporothrix Schenkii*

Nos últimos anos, pesquisadores têm demonstrado interesse na identificação de alvos antigênicos de *S. schenckii* com fins vacinais, terapêuticos e para o desenvolvimento de ferramentas de diagnósticos que possam identificar *Sporothrix spp* de maneira rápida e precisa, em humanos e animais (GUTIERREZ-GALHARDO, FREITAS & VALLE, 2015; OROFINO-COSTA et al., 2017).

A glicoproteína 3-carboximuconato ciclase de 60 kDa em *S. schenckii* e sua forma glicosilada de 70 kDa, conhecida como gp70, presente em *S. brasiliensis* (RUIZ-BACA et al., 2011; CASTRO et al., 2013; FERNANDEZ et al., 2013) tem sido utilizada como proteína alvo para ambos fins mencionados anteriormente (ALMEIDA et al., 2012).

Outra proteína do *S. schenckii*, de antigenicidade e imunogenicidade comprovada em camundongos BALB/c é a enolase de 47kDa (PORTUONDO et al., 2016; 2017; 2019 e TÉLLEZ-MARTÍNEZ et al., 2019). O fato de uma forma recombinante dessa proteína (rSsEno) e peptídeos sintéticos derivados delas terem mostrado reatividade perante sangue de gatos infectados fundamenta o uso de ambas as fontes antigênicas para o diagnóstico da esporotricose felina¹.

1.7 Peptídeos Antigênicos

Peptídeos são definidos como biomoléculas formadas por ligações peptídicas de duas ou mais moléculas de aminoácidos. Os aminoácidos possuem em sua estrutura geral um grupo amina (-NH₂) e um grupo carboxila (-COOH). A ligação peptídica ocorre quando o grupo amina de um aminoácido reage por ligação covalente ao grupo carboxila de outro aminoácido, e libera uma molécula de água (H₂O). Proteínas e peptídeos são diferenciados pelas quantidades de aminoácidos que possuem, sendo as proteínas, macromoléculas, formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, enquanto os peptídeos, são

¹ Dados submetidos para publicação em dezembro de 2021 por Portuondo, DLF et al.

formados por dois a 80 aminoácidos (SU et al., 2013).

Consideradas essenciais e de importância vital, as proteínas estão envolvidas em inúmeros processos bioquímicos, e exercem funções variadas no organismo (TAMURA & ALEXANDER, 2004).

No sistema imune, os anticorpos são proteínas circulantes produzidas por células de defesa que agem em respostas à exposição a estruturas estranhas, os antígenos. Um antígeno, pode ser qualquer molécula biológica, inclusive macromoléculas, como ácidos nucleicos e, novamente, proteínas, que induzem respostas imunológicas específicas (ABBAS, 2012).

Na imunidade adquirida, há dois tipos de respostas imunológicas, a resposta imune humoral e a resposta imune celular. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, que se ligam as imunoglobulinas presentes na membrana da superfície dos linfócitos B (ou células B), atuando como receptores de antígenos, ou presentes na circulação, tecidos e mucosas, que ao reconhecer os antígenos, conectam-se a eles, neutralizando as toxinas, evitando a entrada e disseminação dos microrganismos nas células e preparando para eliminá-los (ALLISON & LAINER, 1987; CHAPLIN, 2010).

Somente macromoléculas são capazes de estimular os linfócitos B para gerar e iniciar a resposta imune humoral (ABBAS, 2012; CANO & LOPERA, 2013).

A imunidade celular é mediada por linfócitos T. Os anticorpos, as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e os receptores de antígenos das células T (TCR), compõem a classe de moléculas usadas no reconhecimento dos antígenos na imunidade celular. As moléculas MHC e TCR reconhecem os peptídeos como antígenos (MANOLIOS et al., 1997).

As macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, geralmente são maiores do que a região de ligação do antígeno ao anticorpo. Por essa razão, qualquer anticorpo se liga apenas a uma parte da macromolécula, denominada epítopo (GERSHONI et al., 2007).

Epítopos antigênicos são definidos como partes do antígeno com características químicas e físicas peculiares, favoráveis ao reconhecimento de

regiões específicas dos linfócitos B ou TCRs, promovendo ativação da resposta imune (ZHAO, WONG & LI, 2011).

Um epítopo pode ser classificado como linear ou conformacional. Os epítomos lineares, também conhecidos como contínuos, são formados por trechos lineares de resíduos na sequência da proteína do antígeno. Enquanto os epítomos conformacionais, ou descontínuos, são formados pela estrutura secundária, terciária ou quaternária de uma proteína, ou pelo dobramento tridimensional normal de polissacarídeos (DHANDA et al., 2017)

Enquanto os TCRs só se ligam à epítomos que formam complexos com as moléculas de MHC, sendo necessário o processamento por Células Apresentadoras de Antígenos (APCs, do inglês, *Antigen Presenting Cells*), os epítomos de linfócitos B não necessitam ser processados por APCs, por estarem localizados na superfície das proteínas, são capazes de ligar diretamente às moléculas de Imunoglobulinas (MANOLIOS et al., 1997).

Os antígenos são amplamente empregados em desenhos de vacinas, novos fármacos e métodos diagnósticos, no entanto, obter quantidades suficientes de antígeno bruto para experimentos, ou produção de vacinas, fármacos e ferramentas diagnósticas é completamente inviável, para isso, a alternativa de sucesso para produção de antígenos é a síntese de peptídeos, que mimetizam o epítopo de proteínas antigênicas dos microrganismos (OLIVE, TOTH & JACKSON, 2001; JARADAT, 2018; APOSTOLOPOULOS et al., 2021; PRADA et al., 2021).

As dificuldades inerentes ao mapeamento de peptídeos por métodos experimentais culminaram na busca por métodos alternativos, e atualmente a predição de peptídeos é feita por ferramentas de Bioinformática. Métodos de análises *in silico* que empregam algoritmos de inteligência artificial e aprendizado de máquina são usados para identificação de peptídeos com potencial antigênico (JESPERSEN et al., 2017; MANAVALAN et al., 2018; LIU, SHI & LI, 2020).

O fato dos antígenos se ligarem diretamente aos epítomos de linfócitos B, de forma altamente seletiva, e por sua capacidade de reconhecimento, conferir proteção a longo prazo contra microrganismos, a identificação desses epítomos é feita por servidores de predição de epítomos de células B, e partir dessa predição, os epítomos são sintetizados (ZHAO, WONG & LI, 2011).

Basicamente, os peptídeos podem ser sintetizados por quatro métodos: 1) Síntese em Solução; 2) Síntese de Peptídeos em Fase Sólida; 3) Síntese Enzimática e 4) Síntese por DNA recombinante. Estes métodos encontram-se divididos em dois grupos: 1) Convergente, onde ocorre a condensação de peptídeos sintetizados e protegidos e 2) Linear, construída adicionando aminoácido por aminoácido, de forma sequencial (MACHADO et al., 2004).

1.8 Síntese Química de Peptídeos

Historicamente, os primeiros estudos sobre ligações peptídicas iniciaram no século XIX. Porém, foi no início do século XX, mais precisamente em 1901, que a síntese foi descrita por Fischer, considerado “pai” da química dos peptídeos, e por Ernest Fourneau. As primeiras sínteses químicas de peptídeos com importância biológica e estruturas determinadas, ocorrem em 1935, com a síntese da Glutathione e da Carnosina. Essa descoberta despertou interesse nos pesquisadores, e em poucos anos, no início da década de 50, vários outros peptídeos de importância biológica haviam sido sintetizados, e suas estruturas determinadas. Desde então, dada a versatilidade química dos peptídeos comparada às proteínas, o interesse em obtê-los, caracterizá-los, aperfeiçoar os métodos envolvidos a cada etapa de síntese passaram a ser minuciosamente estudados, e permanece até os dias atuais (WIELAND E BODANSZKY, 2012; HARRINGTON & MEAD, 1935; DU VIGNEAUD & HUNT, 1936; MACHADO et al., 2004).

Os primeiros peptídeos sintetizados foram em solução. Conhecido como método “clássico”, tem como princípio a esterificação ou amidação da α -carboxila do receptor de acila, ou seja, o acoplamento dos aminoácidos acontece entre seus grupos α -amino-carboxi por ligação peptídica com o auxílio de um reagente acoplante, responsável pela ligação peptídica e liberação de água no meio. Isso permite que a síntese em solução ocorra tanto na direção N-C terminal ou C-N terminal (MARCO, 2013)

Na síntese em solução, as etapas sintéticas são feitas em solução homogênea, havendo necessidade de purificação a cada intermediário obtido, tornando a síntese de peptídeos em solução com poucos resíduos de aminoácidos trabalhosa e demorada (KHAN, 2016)

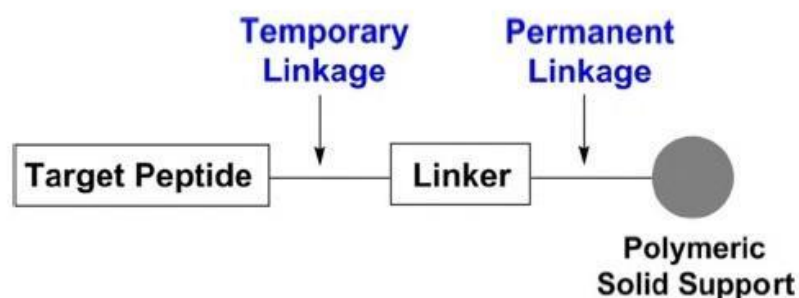
Em 1963, Robert Bruce Merrifield inovou o método de síntese química dos peptídeos ao desenvolver a Síntese Química de Peptídeos em Fase Sólida, (SPFS, do inglês, *Solid Phase Peptide Synthesis* [SPPS]), usando polímeros insolúveis aos reagentes empregados na síntese como suporte sólido (Merrifield, 1964).

O princípio do método criado por Merrifield, a SPFS, consiste inicialmente na desproteção do grupo α -amino, enquanto o grupo carboxílico C-terminal encontra-se unido ao suporte sólido por ligações covalentes, através de uma ligação éster, seguido do acoplamento de aminoácido por aminoácido N-protetido até a obtenção da sequência completa, finalizando com a clivagem do suporte sólido-peptídeo (MERRIFIELD, 1964; ALBERICIO & KATES 2000; ISIDRO-LLOBET, ALVAREZ & ALBERICIO, 2009)

Os suportes sólidos obrigatoriamente necessitam ser insolúveis aos reagentes usados durante à síntese e apresentar estabilidade físico/química perante esses reagentes. O uso de suportes sólidos permite que as reações de acoplamento dos aminoácidos ocorram mais rápidas e com melhores rendimentos, uma vez que é possível usar excessos de aminoácidos e removê-los facilmente ao final de cada etapa, pelo simples processo de lavagem do suporte e filtração (CHAN & WHITE, 2000).

Por esses motivos, embora há diversas opções disponíveis no mercado, os suportes sólidos recomendados na SPFS, são os copolímeros de poliestireno com 1% a 2% de divinilbenzeno. Estes suportes sólidos poliméricos estão ligados permanentemente à um ligante (*Linker*), que facilita a ancoragem temporária do primeiro aminoácido ao suporte polimérico (figura 5). Apresentam-se na forma de grãos, e seu tamanho é referenciado em tamanho de malha (*mesh*), variando geralmente de 100 *mesh* a 200 *mesh* e de 200 *mesh* a 400 *mesh* (ZALIPSKY et al., 1994; CILLI et al., 2017; VAINO & JANDA, 2000; MITCHELL, 2008).

Figura 5. Imobilização do peptídeo ao suporte sólido via Linker.



Referência: Jaradat, 2018. DOI: 10.1007/s00726-017-2516-0.

O grão seco do suporte sólido possui em média cerca de 35 μm e 150 μm de diâmetro, correspondente à 100 *mesh* e 400 *mesh*, respectivamente, porém, na presença de solventes, esse tamanho aumenta em até seis vezes, possibilitando que os ligantes presentes no interior da rede polimérica fiquem expostos, e consequentemente favoreçam as reações de acoplamento dos aminoácidos e o acesso dos solventes (CILLI et al., 2017; MARQUARDT & EIFLER-LIMA, 2001).

Há duas estratégias empregadas na SPFS, a primeira proposta por Merrifield (1964), a *terc*-Butilcarbonil/Benzil (Boc/Benzil), onde o grupo Boc é o protetor do grupo α -amino dos aminoácidos, e a segunda proposta por CARPINO & HAN (1972), a 9-Fluorenilmetiloxycarbonil/*t*Butil (Fmoc/*t*But), onde o grupo Fmoc é o responsável pela proteção do grupo α -amino dos aminoácidos. Mesmo após décadas, e com pesquisas que visam melhorar a aplicação dessas estratégias e simplificar os processos químicos envolvidos, elas permanecem sendo as estratégias padrão da SPFS (MERRIFIELD, 1964; JARADAT, 2018; SHINBARA et al., 2020).

A principal diferença das estratégias Boc/Benzil e Fmoc/*t*But são as condições de desproteção dos grupos α -amino. Na química Boc, a desproteção ocorre com o Ácido Trifluoroacético (TFA) em Diclorometano (DCM), que provoca uma espécie de protonação do grupo α -amino. Pelas condições ácidas em que as reações ocorrem, entre as etapas de desproteção e o acoplamento dos aminoácidos, é necessário que ocorra neutralização, normalmente feita com N, N'-diisopropylethylamine (DIEA) em DCM, para liberar a função amina protonada. Outra particularidade da estratégia Boc/Benzil, são as cadeias

laterais dos aminoácidos estarem protegidos pelo grupo Benzila, e para desproteção desses grupos no processo de clivagem, há necessidade de usar ácidos ainda mais fortes, sendo o de primeira escolha, o Ácido Fluorídrico anidro (HF anidro). Embora o uso de ácidos de intensidade moderada à forte faz com que as etapas de desproteção e clivagem da estratégia Boc/Benzil sejam bem-sucedidas, essas condições são desfavoráveis à duas situações: 1) a degradação aminoácidos e toda cadeia peptídica, e 2) a dificuldade em sintetizar por meios mecânicos, pois o uso de ácidos corrói os equipamentos (SCHNÖLZER et al., 1992; MARCHETTO et al., 2001; NAKAIE et al., 2007; JARADAT, 2018).

As condições químicas menos agressivas aplicadas à estratégia Fmoc/*t*But quando comparadas à estratégia Boc/Benzil, tornaram a estratégia Fmoc/*t*But a mais utilizada desde sua implementação, podendo ser empregada de forma manual ou automatizada (MÄDE, ELS-HEINDL E BECK-SICKINGER, 2014; WILSON et al., 2016). Figura 4.

Na química Fmoc/*t*But os solventes de primeira escolha são N,N-Dimetilformamida (DMF) e DCM, utilizados nas etapas de desproteção, acoplamento e lavagens. O DMF trata-se de solvente orgânico polar, e por essa razão favorece as reações de desproteção do grupo Fmoc, enquanto o DCM, solvente não polar, é usado para eliminar os resíduos de DMF após as lavagens (FIELDS & NOBLE, 1990).

Além desses solventes, faz parte da química Fmoc/*t*But os reagentes de acoplamento, que atuam favorecendo a ocorrência das ligações peptídicas. Eles encontram-se divididos em dois grupos: 1) Carbodiimidas, cujo o mecanismo básico é a formação da O-acilisourea, que por aminólise da amina forma ligações amidas. Exemplos de ativadores dessa classe, usados em nossas sínteses, é o diisopropilcarbodiimida (DIC) que quando associado ao ativador secundário, o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), reage com o intermediário O-acilisourea formado pelo DIC, produzindo éster ativo que é menos reativo e pouco propenso à racemização, conferindo maior eficiência ao acoplamento. 2) Sais de ônio, são os sais de fosfônio e amino/urônio, N, N, N', N'-tetrametil O-(1H-benzotriazol-1-il)urônio (HBTU), O-(1H-6-Colorobenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluroniú hexafluorofosfato (HCTU), tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-

1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU) são outros acopladores frequentemente usados em síntese (CARPINO et al.,1994; CHAN & WHITE, 2000).

A síntese peptídica por Fmoc, inicia-se quando porção N-terminal do primeiro aminoácido com grupo α - amino protegido Fmoc é ligado ao grupo reativo da resina, com os reagentes de acoplamento, seguido de lavagens com o solvente (MERRIFIELD, 1964; ALBERICIO & KATES 2000; ISIDRO-LLOBET, ALVAREZ & ALBERICIO, 2009).

A desproteção do grupo Fmoc ocorre facilmente ao utilizar uma base, geralmente a Piperidina (PP) ou seu análogo, 4-metil-piperidina (4MP), sem interferir no ligante entre a resina e o peptídeo ou demais grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos, seguidas de lavagens com DMF, cuja a função é imobilizar a cadeia lateral protetora dos aminoácidos (FIELDS & NOBLE, 1990; LUNA et al., 2016).

O aminoácido seguinte com o grupo α -amino protegido é ativado no grupo carboxil na presença dos acopladores, por exemplo, DIC e HOBt. O grupo α -amino do aminoácido anterior (neste caso, o primeiro aminoácido) ataca o grupo carboxil ativado do segundo aminoácido, formando a ligação peptídica. Essas etapas são frequentemente repetidas até que ocorra o acoplamento do último aminoácido da sequência peptídica (FIELDS & NOBLE, 1990).

A qualidade das etapas de desproteção e acoplamento são acompanhadas pelo teste colorimétrico de ninidrina. O teste de Ninidrina é fundamentado na reação da ninidrina com aminas. Quando os grupos α -amino estão livres para receber o aminoácido, durante a desproteção, as aminas resultantes da reação com a ninidrina são aminas primárias, e adquirem coloração azul intensa. E, quando estão protegidas, após o acoplamento do aminoácido, as aminas são secundárias, e adquirem coloração entre amarelo e castanho, pouco intensa. Pelo teste de Ninidrina é possível evitar a formação de sequências peptídicas incompletas (KAISER et al.,1970).

O peptídeo completo é desprotegido, e a clivagem do peptídeo-resina é feita com solução contendo TFA, denominada solução de clivagem, que rompe a ligação éster formada entre o peptídeo e a resina. Ao final do processo de clivagem, o peptídeo encontra-se dissolvido na solução de clivagem, e a separação ocorre primeiro com a filtração da solução de clivagem para

separação das partículas de resina, seguida pela precipitação do peptídeo na solução de clivagem com várias lavagens usando éter gelado (FIELDS & NOBLE, 1990; CHAN & WHITE, 2000).

1.8.1 Purificação de peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE, em português, ou em inglês, *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*, HPLC -, é a técnica mais comum usada atualmente para purificação de peptídeos (ISIDRO-LLOBET et al., 2019).

O princípio da cromatografia na purificação de peptídeos consiste na separação do peptídeo de possíveis compostos não desejáveis formados durante a síntese, com base em sua afinidade relativa as duas fases que compõem o método cromatográfico, conhecidos como fase móvel e fase estacionária (MANT et al., 2007).

Na fase móvel os componentes, quando isolados, movem-se por um solvente fluído - líquido ou gasoso, e na fase estacionária, a substância a ser purificada ficará fixa na superfície de outro material - líquido ou sólido (MÜLLER-SPÄTH et al., 2013).

O método base da CLAE consiste na passagem da fase móvel líquida contendo a amostra a ser purificada, de forma com que ela flua pela fase estacionária, localizada no interior de uma coluna, após a aplicação de alta pressão acionada por bombas que compõem o sistema CLAE e são responsáveis pela movimentação da fase móvel sobre a fase estacionária (MAN et al., 2007).

O sistema de bombas é o diferencial e o mecanismo mais importante da CLAE, pois é através desse sistema associado a aplicação de pressão, que ocorre o movimento dos solventes com a amostra pela coluna até o detector. Geralmente, em operações normais no CLAE, a pressão aplicada varia entre 2000 e 5000 PSI. Dada a importância do sistema de bombeamento, afim de garantir qualidade e eficiência na purificação, e reprodutibilidade nas corridas subsequentes, é fundamental que a taxa de bombeamento de fluxo seja uniforme e constante (SNYDER, 2000).

As colunas cromatográficas usadas na purificação de peptídeos em sua maioria são formadas por partículas de sílica, porosas e esféricas, e sua

estrutura permite o uso de alta pressão para conduzir a amostra pela fase móvel, em curto intervalo de tempo (ALI et al., 2012).

A purificação é obtida pela interação diferencial das biomoléculas peptídicas com a matriz da coluna. Os sinais das biomoléculas separadas são detectados por um detector cromatográfico, conectado ao final da coluna cromatográfica, que imediatamente após o contato com as biomoléculas, emitem sinais elétricos na forma de picos (JADAUN et al., 2017).

Os detectores mais utilizados em CLAE são os detectores de UV-visível. Esses detectores são formados por espectrofotômetro, que mede a absorção de luz dos compostos em determinados comprimentos de onda, abrangendo as regiões visível e ultravioleta do espectro eletromagnético (NIKOLIN et al., 2004).

1.8.2 Espectrometria de Massas

A caracterização pós-síntese de peptídeos é uma etapa de extrema importância para verificar e garantir que a estrutura molecular foi produzida corretamente. Dos vários métodos analíticos que compõe as análises proteômicas, a espectrometria de massas, em inglês *Mass Spectrometry* (MS), fornece a medição molecular mais eficiente (GRIFFIN & AEBERSOLD, 2001; AEBERSOLD & MANN, 2003).

O desenvolvimento da MS foi em 1910, onde o ilustre físico inglês Joseph J. Thompson separou moléculas de gás conforme suas massas, a partir de análises com raios positivos. Francis W. Aston, aperfeiçoou o método desenvolvido por Thompson, afim de alcançar uma separação ainda maior de íons de diferentes massas, no entanto, com a mesma relação carga/massa (SQUIRES, 1998).

O primeiro espectrômetro moderno foi desenvolvido em 1918, por Arthur J. Dempster, e melhorado no ano seguinte por Francis W. Aston. Os conceitos desenvolvidos por Dempster e Aston permanecem essenciais no desenvolvimento de espectrômetros modernos (GLISH & VACHET, 2003).

A evolução das técnicas aplicadas à MS começou na década de 50. No entanto, o avanço da MS com aplicações em biomoléculas foi na década de 80, com o desenvolvimento das técnicas *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) e da *Electrospray Ionization* (ESI) (BURDICK & STULTS, 1997).

O espectrômetro de massas, é formado por um compartimento operado em condições de alto vácuo, e este compartimento é composto pelas seguintes partes: 1) Sistema injetor de amostras, 2) Fonte de íons, em que os componentes analisados são convertidos em íons, 3) Analisador, onde os íons são separados em função da relação massa e carga (m/z) e 4) Detector de íons, responsável por transformar a corrente de íons detectadas em sinais elétricos e transmiti-los para um sistema de processamento de dados no formato de espectros de massas (CANTÚ et al., 2008).

1.9 Imunossensores Eletroquímicos

Sensores são dispositivos capazes de detectar um analito formados por: (1) unidade receptora, de natureza biológica, orgânica ou inorgânica, que terá interação com o analito; (2) por arquitetura de interface fabricado em diversos materiais como polímeros e nanopartículas, onde acontecerá reações específicas e será emitido um sinal mensurável; (3) elemento transdutor, como eletrodos, onde o sinal transdutor será convertido em sinal eletrônico e amplificador por um circuito detector presente no equipamento de leitura e (4) software que processará os dados (GRIESHABER et al., 2008). Compreendido a composição dos sensores, biossensores se difere por possuírem uma unidade receptora formada por componentes biológicos, os biorreceptores, acoplados à um transdutor, que emitirá sinal em nanoescala (RICCARDI, COSTA & YAMANAKA, 2002). A interação de um biorreceptor e seu ligante depende da afinidade entre eles, medida pela constante de dissociação (K_d). Antígenos e anticorpos possuem alta afinidade ($K_d = 10^{-12}$ a 10^{-8} mol L⁻¹), e a interação que ocorre entre eles é semelhante ao modelo de interação chave-fechadura, onde os antígenos ligam somente a anticorpos específicos. A ligação antígenos-anticorpos resulta em alterações físico-químicas e emitem sinais que produzem pequenas correntes elétricas identificadas por transdutores (NELSON & COX, 2014; RANJAN et al., 2021).

Imunossensor é um tipo de biossensor que possui como biorreceptores antígeno ou anticorpo imobilizado na superfície do transdutor. A variedade de transdutores permitiu o desenvolvimento de diversos imunossensores nos últimos anos, no entanto, os imunossensores eletroquímicos ganharam notoriedade dentre os demais, pela sensibilidade das medidas eletroquímicas

associada a seletividade das reações entre antígeno e anticorpo (RICCARDI, COSTA E YAMANAKA, 2002; AYDIN, AYDIN & SEZGINTÜRK, 2019).

Imunossensores eletroquímicos têm sido desenvolvidos e aplicados com sucesso no diagnóstico de diversas doenças que vão dos mais diversos tipos de câncer, por exemplo, na detecção do antígeno CA-125 em câncer de ovário, as doenças infecciosas, como na identificação de proteínas epimastigota presente na membrana do *Trypanossoma cruzi* no diagnóstico da doença de Chagas (FERREIRA et al., 2005; GASPAROTTO et al., 2017; RANJAN et al., 2021).

A grande vantagem dos imunossensores eletroquímicos é a possibilidade de fazer as medidas em qualquer local, sem necessidade de estruturas laboratoriais complexas, principalmente, pelo fato de atualmente os dados serem processados diretamente por meio de conexão com celular, além de oferecer resultados rápidos, usando pequenos volumes (μL) de amostras, com alta sensibilidade e especificidade, e custo acessível (AYDIN, AYDIN & SEZGINTÜRK, 2019).

Trazendo essa alternativa de método diagnóstico para infecções que acometem animais, imunossensores eletroquímicos foram desenvolvidos para diagnósticos da leishmaniose (CORDEIRO et al., 2019; MARTINS et al., 2020). Até o presente momento não verificamos pesquisas publicadas ou testes diagnósticos comerciais disponíveis de plataformas diagnósticas baseadas em imunossensor eletroquímico para esporotricose felina.

6. CONCLUSÕES

1. Os soros de gatos positivos recebidas do Lapclin-Dermzoo apresentaram anticorpos IgG contra o *Sporothrix schenckii*.
2. Os soros de gatos negativos, das seis amostras recebidas, três ficaram de acordo com o *cutoff* confirmando que não há presença de anticorpos IgG contra o *Sporothrix schenckii* e foram elas selecionadas para padronização do sensor.
3. O ELISA demonstrou que a melhor imunorreatividade da enolase foi na concentração de 1g, com a amostra diluída 1:100.
4. O alinhamento das sequências obtidas pelos servidores BEIpred 2.0, DLBEpitope, iBCEL-EL e LBtope, de predição de epítipo linear de célula B retornaram uma única a sequência, a EDVKKYDLDFKNPE (PESs01).
5. O método estabelecido nas condições CLAE analítico, e posteriormente escalonado para o CLAE semi-preparativo foi eficiente para purificação do PESs01.
6. O Espectro de Massas demonstrou que os íons moleculares $[MH_2+]$ ²⁺ e $[MH_3+]$ ³⁺ do PESs1 eram correspondentes a massas teóricas calculadas com auxílio das CEM Peptide Calculator e PepCal, e a sequência sintetizada estava de acordo com a sequência do PESs01, indicando que síntese do PESs01 foi realizada com êxito.
7. As medidas amperométricas mostraram resultados importantes, embora estatisticamente não significantes, mas que indicam após ajustes a potencial aplicabilidade do Peptídeo PESs01 na plataforma eletroquímica para o diagnóstico da esporotricose felina.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul. *Imunologia celular e molecular* 7a edição. Elsevier Brasil, 2012.
- AEBERSOLD, Ruedi; MANN, Matthias. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- ALBERICIO, Bonds Fernando; KATES, Steven A. Coupling methods: solid-phase formation of amide and ester bonds. In: **Solid-Phase Synthesis**. CRC Press, 2000. p. 297-352.
- ALBUQUERQUE, Priscila Costa *et al.* Bibliometric assessment and implications for practice of sporotrichosis research (1945-2018). **F1000Research**, v. 9, 2020.
- ALI, Imran *et al.* Recent trends in ultra-fast HPLC: New generation superficially porous silica columns. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 23, 2012, p. 3235-3249. DOI 10.1002/jssc.201200454.
- ALLISON, James P.; LANIER, Lewis L. Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex. **Annual review of immunology**, v. 5, n. 1, p. 503-540, 1987.
- ALMEIDA-PAES, Rodrigo *et al.* Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- APOSTOLOPOULOS, Vasso *et al.* A global review on short peptides: frontiers and perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 430, 2021.
- ARCE-FONSECA, Minerva *et al.* Recombinant enolase of *Trypanosoma cruzi* as a novel vaccine candidate against Chagas disease in a mouse model of acute infection. **Journal of immunology research**, v. 2018, 2018.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I. *et al.* Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651-655, 2009.
- AYDIN, Elif Burcu; AYDIN, Muhammet; SEZGINTÜRK, Mustafa Kemal. Advances in electrochemical immunosensors. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 92, p. 1-57, 2019.
- BAPTISTA, Vivian S. *et al.* Promising application of the SsCBF ELISA test to monitor the therapeutic response of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* from Brazilian epidemics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 145-153, 2021.
- BARROS, Mônica Bastos de Lima. *et al.* Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 455-460, 2010.

BARROS, Mônica Bastos de Lima; DE ALMEIDA PAES, Rodrigo; SCHUBACH, Armando Oliveira. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.

BARROS, Mônica Bastos de Lima *et al.* An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiology & Infection**, v. 136, n. 9, p. 1192-1196, 2008.

BENTO, Aurélio de Oliveira *et al.* The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009693, 2021.

BERNARDES-ENGEMANN, Andréa Reis *et al.* Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 28-33, 2015.

BLYTHE, Martin J.; FLOWER, Darren R. Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods. **Protein Science**, v. 14, n. 1, p. 246-248, 2005.

BONIFAZ, Alexandro; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, Denisse. Sporotrichosis: an overview. **Italian Journal of Dermatology and Venereology**, v. 145, p. 6509-6657, 2010.

BURDICK, Daniel J.; STULTS, John T. Analysis of peptide synthesis products by electrospray ionization mass spectrometry. **Methods in Enzymology**, v. 289, p. 499-519, 1997.

CANO, R. Luz Elena; LOPERA, H. Damaris E. Introduction to T and B lymphocytes. In: Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. El Rosario University Press, 2013.

CANTÚ, Marcelo Delmar *et al.* Peptide sequencing using mass spectrometry: a practical guide. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.

CARLOS, Iracilda Zeppone; BATISTA-DUHARTE, Alexander. Sporotrichosis: an emergent disease. In: **Sporotrichosis**. Springer, p. 1-23, 2015.

CARPINO, Louis A. *et al.* Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 2, p. 201-203, 1994.

CARPINO, Louis A.; HAN, Grace Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 37, n. 22, p. 3404-3409, 1972.

CASTRO, Rafaela A. *et al.* Differences in cell morphometry, cell wall topography and Gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75656, 2013.

CAVALCANTI, Maíra C. H.; PEREIRA, Sandro A.; Gremião, Isabela D. F.; MENEZES, Rodrigo C. Esporotricose, um agravamento de notificação compulsória e seus riscos em gatos domésticos: 15 casos com lesão nasal refratária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 15, n. 3, p. 94-94, 2017.

CHAKRABARTI, Arunaloke *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 3-14, 2015.

CHAN, WCWPD; WHITE, Peter (Ed.). **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. OUP Oxford, 1999.

CHAPLIN, David D. Overview of the immune response. *Journal of allergy and clinical immunology*, v. 125, n. 2, p. S3-S23, 2010.

CILLI, Eduardo M. *et al.* Correlation between Solvation of Peptide-Resins and Solvent Properties1. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 25, p. 8992-9000, 1996.

CILLI, Eduardo Maffud *et al.* Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a metodologia de síntese de peptídeo, p. 175 -196. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017.

CORDEIRO, Taís A. R. *et al.* Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Talanta**, v. 195, p. 327-332, 2019.

CÓRDOBA, Susana *et al.* Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 441-448, 2018.

DHANDA, Sandeep Kumar *et al.* Novel in silico tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 18, n. 3, p. 467-478, 2017.

DÍAZ-RAMOS, Àngels *et al.* α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

DONOFRIO, Fabiana Cristina *et al.* Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 706-713, 2009.

DU VIGNEAUD, Vincent; HUNT, Madison. The synthesis of D-carnosine, the enantiomorph of the naturally occurring form, and a study of its depressor effect on the blood pressure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 93-100, 1936.

DUANGKAEW, Lerpen *et al.* Cutaneous sporotrichosis in a stray cat from Thailand. **Medical Mycology Case Reports**, v. 23, p. 46-49, 2019.

DUARTE, Mariana Costa *et al.* Performance of *Leishmania braziliensis* enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 238, p. 77-81, 2017.

DUTTA, Sneha *et al.* Immunogenicity and protective potential of a *Plasmodium spp.* enolase peptide displayed on archaeal gas vesicle nanoparticles. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2015.

EL-MANZALAWY, Yasser; DOBBS, Drena; HONAVAR, Vasant G. In silico prediction of linear B-cell epitopes on proteins. In: **Prediction of Protein Secondary Structure**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 255-264.

ETCHECOPAZ, A. N. *et al.* Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, n. 1, p. 100908, 2020.

FERNANDES, Geisa Ferreira *et al.* Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: a forgotten and re-emergent pathogen. **Open Mycol J**, v. 3, n. 1, p. 48-58, 2009.

FERNANDES, Geisa Ferreira *et al.* Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary microbiology**, v. 147, n. 3-4, p. 445-449, 2011.

FERREIRA, Antônio Aparecido Pupim *et al.* Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 1, p. 175-181, 2005.

FIELDS, Gregg B.; NOBLE, Richard L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International journal of peptide and protein research**, v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990.

FREIRE, Renato S.; PESSOA, Christiana A.; KUBOTA, Lauro T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, p. 381-389, 2003.

FREITAS, Dayvison F. S. *et al.* Sporotrichosis in the central nervous system caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 4, p. 663-664, 2015.

GASPAROTTO, Gisane *et al.* Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 1240-1247, 2017.

GERSHONI, Jonathan M. *et al.* Epitope mapping. **BioDrugs**, v. 21, n. 3, p. 145-156, 2007.

GLISH, Gary L.; VACHET, Richard W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature reviews drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 140-150, 2003.

GLOWALLA, Eva *et al.* Proteomics-based identification of anchorless cell wall proteins as vaccine candidates against *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2719-2729, 2009.

GONSALES, Fernanda Fidelis *et al.* Esporotricose na cidade de Guarulhos, São Paulo, Brasil. **Nosso Clín.**, p. 18-24, 2018.

GREENBAUM, Jason A. *et al.* Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools. **Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal**, v. 20, n. 2, p. 75-82, 2007.

GREMIÃO, Isabella D. F. *et al.* Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2015.

GREMIÃO, Isabella D. F. *et al.* Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 3, p. 621, 2020.

GREMIÃO, Isabella D. F. *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 107-124, 2021.

GRIESHABER, Dorothee *et al.* Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

GRIFFIN, Timothy J.; AEBERSOLD, Ruedi. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 45497-45500, 2001.

GUARRO, Josep; GENÉ, Josepa; STCHIGEL, Alberto M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUTERRES, Karina Affeldt *et al.* The Use of (1–3) β -glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3, p. 217-221, 2014.

GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara; FREITAS, Dayvison Francis Saraiva; VALLE, Antonio Carlos Francesconi do. Clinical forms of human sporotrichosis

and host immunocompetence. In: **Sporotrichosis**. Springer, Cham, p. 73-82, 2015.

HAN, Hock Siew; KANO, Rui. Feline sporotrichosis in Asia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 125-134, 2021.

HARINGTON, Charles Robert; MEAD, Thomas Hobson. Synthesis of glutathione. **Biochemical Journal**, v. 29, n. 7, p. 1602, 1935.

HASSAN, Muhammad et al. Molecular docking of alpha-enolase to elucidate the promising candidates against *Streptococcus pneumoniae* infection. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 1, p. 73-84, 2021.

HE, Zhengxin et al. Serological response and diagnostic value of recombinant candida cell wall protein enolase, phosphoglycerate kinase, and β -glucosidase. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 920, 2015.

HEKTOEN, Ludvig; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **The Journal of experimental medicine**, v. 5, n. 1, p. 77, 1900.

ISIDRO-LLOBET, Albert et al. Sustainability challenges in peptide synthesis and purification: from R&D to production. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 84, n. 8, p. 4615-4628, 2019.

JADAUN, Gaurav Pratap Singh et al. HPLC for Peptides and Proteins: Principles, Methods and Applications. **Pharmaceutical Methods**, v. 8, n. 1, 2017.

JESPERSEN, Martin Closter 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, 2017.

JIANG, Wei et al. Identification and characterization of an immunogenic antigen, enolase 2, among excretory/secretory antigens (ESA) of *Toxoplasma gondii*. **Protein Expression and Purification**, v. 127, p. 88-97, 2016.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KHAN, Riaz A. Synthesis of Met-enkephalin by solution-phase peptide synthesis methodology utilizing para-toluene sulfonic acid as N-terminal masking of L-methionine amino acid. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 88, n. 6, p. 884-888, 2016.

KRINGELUM, Jens Vindahl et al. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 12, p. e1002829, 2012.

KRINGELUM, J. V. et al. Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 1–2, p. 24–34, jan. 2013.

LARSSON, Carlos Eduardo. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

LIU, Tao; SHI, Kaiwen; LI, Wuju. Deep learning methods improve linear B-cell epitope prediction. **BioData Mining**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2020.

LLORET, Albert et al. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 619-623, 2013.

LOPES-BEZERRA, Leila M.; SCHUBACH, Armando; COSTA, Rosane O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.

LOUREIRO Y PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, Leila M. Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*: a serological study. **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 2000.

LUNA, Omar F. et al. Deprotection reagents in Fmoc solid phase peptide synthesis: moving away from piperidine?. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1542, 2016.

LUTZ, Adolpho; SPLENDORE, Alffonso. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica de São Paulo**, v. 21, p. 443-450, 1907.

MACÊDO-SALES, Pâmella Antunes de et al. Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 2, p. 7-7, 2018a.

MACÊDO-SALES, Pâmella A. et al. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2018.

MACHADO, Alessandra et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química nova**, v. 27, p. 781-789, 2004.

MÄDE, Veronika; ELS-HEINDL, Sylvia; BECK-SICKINGER, Annette G. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 1197-1212, 2014.

MANAVALAN, Balachandran *et al.* iBCE-EL: a new ensemble learning framework for improved linear B-cell epitope prediction. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1695, 2018.

MANOLIOS, Nicholas *et al.* T-cell antigen receptor transmembrane peptides modulate T-cell function and T cell-mediated disease. **Nature medicine**, v. 3, n. 1, p. 84-88, 1997.

MANT, Colin T. *et al.* HPLC analysis and purification of peptides. In: **Peptide Characterization and Application Protocols**. Humana Press, p. 3-55, 2007.

MARCHETTO, Reinaldo *et al.* Two short peptides including segments of subunit A of Escherichia coli DNA gyrase as potential probes to evaluate the antibacterial activity of quinolones. **Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society**, v. 7, n. 1, p. 27-40, 2001.

MARCHETTO, Reinaldo; SCHREIER, Shirley; NAKAIE, Clovis R. A novel spin-labeled amino acid derivative for use in peptide synthesis: (9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 23, p. 11042-11043, 1993.

MARCO, Rosaria de *et al.* C→N and N→C solution phase peptide synthesis using the N-acyl 4-nitrobenzenesulfonamide as protection of the carboxylic function. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 23, p. 3786-3796, 2013.

MARCOS, Caroline Maria *et al.* Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 5, p. 557-570, 2012.

MARIMON, Rita *et al.* Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251-3256, 2006.

MARIMON, Rita *et al.* *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Sabouraudia**, v. 46, n. 6, p. 621-625, 2008.

MARIMON, RITA *et al.* Three new *Sporothrix* species of clinical interest: *S. brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2007.

MARQUARDT, Marcos; EIFLER-LIMA, Vera Lucia. The solid phase organic synthesis and its most used polymeric supports. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 846-855, 2001.

MARTINS, Beatriz R. *et al.* Development of an electrochemical immunosensor for specific detection of visceral leishmaniasis using gold-modified screen-printed carbon electrodes. **Biosensors**, v. 10, n. 8, p. 81, 2020.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. III. An improved synthesis of bradykinin. **Biochemistry**, v. 3, n. 9, p. 1385-1390, 1964.

MIRANDA, Luisa HM *et al.* Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 36, n. 4, p. 425-432, 2013.

MITCHELL, Alexander R. Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment. **Peptide Science**, v. 90, n. 3, p. 175-184, 2008.

MÜLLER-SPÄTH, THOMAS *et al.* Enabling high purities and yields in therapeutic peptide purification using multicolumn countercurrent solvent gradient purification. **Chem. Today**, v. 31, p. 56-60, 2013.

NAKAIE, Clovis Ryuchi *et al.* Acid cleavage reactions of amino acids and peptides bound to polymers: relevance for peptide synthesis methodology. In: Nantes IL, Brochsztain S, editors. *Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media*. Kerala: Research Signpost. p. 141-160, 2007.

NAKAMURA, Noriko *et al.* Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (*eno4*) gene causes sperm structural defects and male infertility. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 4, p. 90, 1-12, 2013.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.

NIKOLIN, Branko *et al.* High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 5, 2004.

OLIVE, C.; TOTH, I.; JACKSON, D. Technological advances in antigen delivery and synthetic peptide vaccine developmental strategies. **Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 429-438, 2001.

OLIVEIRA, Daniele C. *et al.* Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3047-3049, 2011.

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista *et al.* Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 31, n. 1, p. 2-6, 2014.

OROFINO-COSTA, Rosane *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 92, p. 606-620, 2017.

PEREIRA, Sandro A. *et al.* Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 4, p. 220-223, 2011.

PEREIRA, Sandro Antonio *et al.* The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 392-393, 2014.

PONOMARENKO, Julia V.; BOURNE, Philip E. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. **BMC structural biology**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2007.

PORTUONDO, Deivys Leandro *et al.* A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 300-309, 2016.

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**, v. 35, n. 34, p. 4430-4436, 2017.

PORTUONDO, Deivys Leandro *et al.* Immunization with recombinant enolase of *Sporothrix spp.*(rSsEno) confers effective protection against sporotrichosis in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

PRADA, Y. Andrea *et al.* Design and characterization of high-affinity synthetic peptides as bioreceptors for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, n. 17, p. 4545-4555, 2021.

QING LI, Wen *et al.* Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 33, p. 5526-5533, 2011.

RAMOS, Vanessa *et al.* Bone sporotrichosis: 41 cases from a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 3, p. e0009250, 2021.

RANJAN, Pushpesh *et al.* Rapid diagnosis of SARS-CoV-2 using potential point-of-care electrochemical immunosensor: Toward the future prospects. **International Reviews of Immunology**, v. 40, n. 1-2, p. 126-142, 2021.

RICCARDI, Carla dos Santos; COSTA, Paulo Inácio da; YAMANAKA, Hideko. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002.

ROBERT, Xavier; GOUET, Patrice. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W320-W324, 2014.

ROCHETTE, F.; ENGELN, M.; VANDEN BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in animal health—practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 31-53, 2003.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383-387, 2014.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging microbes & infections**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2014a.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, 2015.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal–animal transmission. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, p. e1005638, 2016.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 246-264, 2016a.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 813-842, 2020.

RODRÍGUEZ-BRITO, Sabrina *et al.* Differential identification of *Sporothrix* spp. and *Leishmania* spp. by conventional PCR and qPCR in multiplex format. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 22-27, 2015.

ROMEO, Orazio; CRISEO, Giuseppe. What lies beyond genetic diversity in *Sporothrix schenckii* species complex? New insights into virulence profiles, immunogenicity and protein secretion in *S. schenckii* sensu stricto isolates. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 203-206, 2013.

ROSSOW, John A. *et al.* A one health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in South America. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 247, 2020.

RUIZ-BACA, Estela *et al.* 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 248-250, 2011.

SANCHOTENE, Karine Ortiz *et al.* *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652-658, 2015.

SANTANA, Paula A. *et al.* New insight to the rol of α -enolase (Eno-1) as immunological marker in rainbow trout fry. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 123, p. 104163, 2021.

SCHNÖLZER, Martina *et al.* In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis: Rapid, high yield assembly of difficult sequences. **International journal of peptide and protein research**, v. 40, n. 3-4, p. 180-193, 1992.

SCHUBACH, Tânia M. P. *et al.* Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998–2003). **Sabouraudia**, v. 44, n. 1, p. 87-92, 2006.

SCHWARTZ, Ilan S.; KENYON, Chris; THOMPSON, George R. Endemic mycoses: What's new about old diseases?. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 3, n. 2, p. 71-80, 2016.

SHINBARA, Koki *et al.* Methodologies for backbone macrocyclic peptide synthesis compatible with screening technologies. **Frontiers in chemistry**, p. 447, 2020.

SILVA, Francine S. *et al.* Esporotricose felina refratária: uma análise comparativa sobre os aspectos clínico, histopatológico e citopatológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 42, 2022.

SILVA, Jéssica N. *et al.* Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 8, p. 880-884, 2015.

SINGH, Harinder; ANSARI, Hifzur Rahman; RAGHAVA, Gajendra PS. Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e62216, 2013.

SNYDER, Lloyd R. Peer Reviewed: HPLC: Past and Present. 2000.

SQUIRES, Gordon. Francis Aston and the mass spectrograph. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 23, p. 3893-3900, 1998.

SU, Mingming *et al.* Small proteins: untapped area of potential biological importance. **Frontiers in genetics**, v. 4, p. 286, 2013.

TAMURA, K.; ALEXANDER, R. W. Peptide synthesis through evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 11, p. 1317-1330, 2004.

TÉLLEZ-MARTÍNEZ, Damiana *et al.* Sporothrixschenckii complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology**, v. 160, n. 11, p. 2352-2365, 2014.

TÉLLEZ-MARTÍNEZ, Damiana et al. Prophylactic and therapeutic vaccines against sporotrichosis. Feasibility and prospects. **Microbes and Infection**, v. 21, n. 10, p. 432-440, 2019.

TERRIER, Benjamin et al. Alpha-enolase: a target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 3, p. 176-182, 2007.

VAINO, Andrew R.; JANDA, Kim D. Solid-phase organic synthesis: a critical understanding of the resin. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 579-596, 2000.

VAINO, Andrew R.; JANDA, Kim D. Solid-phase organic synthesis: a critical understanding of the resin. **Journal of combinatorial chemistry**, v. 2, n. 6, p. 579-596, 2000.

VARNAVA, Kyriakos G.; SAROJINI, Vijayalekshmi. Making solid-phase peptide synthesis greener: a review of the literature. **Chemistry–An Asian Journal**, v. 14, n. 8, p. 1088-1097, 2019.

WIELAND, Theodor; BODANSZKY, Miklos. **The world of peptides: a brief history of peptide chemistry**. Springer Science & Business Media, 2012.

WILSON, Krista R. et al. Microwave-assisted cleavage of Alloc and Allyl Ester protecting groups in solid phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, v. 22, n. 10, p. 622-627, 2016.

YU, Xiaohong et al. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 67-74, 2013.

ZALIPSKY, Samuel et al. Preparation and applications of polyethylene glycol-polystyrene graft resin supports for solid-phase peptide synthesis. **Reactive Polymers**, v. 22, n. 3, p. 243-258, 1994.

ZHANG, Y. et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, p. 1, 2015.

ZHAO, Liang; WONG, Limsoon; LI, Jinyan. Antibody-specified B-cell epitope prediction in line with the principle of context-awareness. **IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics**, v. 8, n. 6, p. 1483-1494, 2011.