



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Marianna de Carvalho Clímaco

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE VACINA CONTRA
TRIPANOSSOMATÍDEOS COMPOSTA POR SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS
SELECIONADAS POR PHAGE DISPLAY**

Belo Horizonte, MG

2021

Marianna de Carvalho Clímaco

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE VACINA CONTRA
TRIPANOSSOMATÍDEOS COMPOSTA POR SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS
SELECIONADAS POR PHAGE DISPLAY**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Belo Horizonte, MG

2021

043

Clímaco, Marianna de Carvalho.

Desenvolvimento e avaliação de vacina contra Tripanossomatídeos composta por sequências peptídicas selecionadas por Phage Display [manuscrito] / Marianna de Carvalho Clímaco. – 2021.

152 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Leishmaniose. 3. Doença de Chagas. 4. Vacinas. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEFESA DE TESE - 326/2021/14

"DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE VACINA CONTRA TRIPANOSSOMATÍDEOS COMPOSTA POR SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS SELECIONADAS POR PHAGE DISPLAY."

ALUNA: MARIANNA DE CARVALHO CLÍMACO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA, BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DE PARASITOS

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **05 de novembro de 2021**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Claudia Ida Brodskyn

FIOCRUZ/BA

Márcio Sobreira Silva Araújo

(IRR/FIOCRUZ)

Silvio Santana Dolabella

(UFS)

Wanderson Duarte da Rocha

(UFPR)

Ricardo Toshio Fujiwara - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 05 de novembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 23/11/2022, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1918381** e o código CRC **CE2979F3**.

Referência: Processo nº 23072.269174/2022-61

SEI nº 1918381

COLABORADORES

Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

Dra. Lílian Lacerda Bueno

Ms. Ana Clara Gazzinelli Guimarães

Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui

Dra. Denise Silva Nogueira

Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira

Dra. Jacqueline Araújo Fiuza

Ms. Lucas Kraemer Rocha

Dra. Luísa Mourão Dias Magalhães

Dra. Mariana Santos Cardoso

Dra. Patrícia Silveira

Dra. Vânessa Gomes Fraga

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, do departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e financiado pela CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFMG.

AGRADECIMENTOS

Encerro o doutorado com a certeza de que as experiências que vivi neste período contribuíram para me tornar uma pesquisadora mais competente, uma estudante mais curiosa e uma brasileira completamente desequilibrada. Viver no Brasil e trabalhar com ciência durante um governo negacionista não é uma das tarefas mais fáceis, então me permitam a licença poética do meu senso de humor peculiar ao longo destes agradecimentos. Para balancear as “sem noções” que certamente permearão minha escrita, começo este texto com uma citação clichê (mas importante) de John Donne: *“No man is an island entire of itself; every man is a piece of the continent, a part of the main”*. Tive a imensa sorte de estar rodeada de pessoas incríveis que deixaram comigo uma parte de si mesmas, seja através da discussão de um resultado científico ou da discussão sobre a comida junina se chamar canjica ou mungunzá (é mungunzá).

Agradeço primeiramente ao departamento e à Pós Graduação em Parasitologia por dar o suporte necessário para o desenvolvimento de tantos trabalhos importantes e de qualidade... À Sibeles e Sumara por todo apoio, disponibilidade e paciência. Agradeço também aos órgãos de fomento por viabilizar minha formação e minha pesquisa dentro da universidade pública. Ao Dr. Abhay Satoskar agradeço por me receber em seu laboratório durante o doutorado sanduíche e por viabilizar o desenvolvimento de parte importante deste trabalho.

Ao meu orientador, Ricardo Fujiwara, agradeço por sempre me inspirar a pensar de forma original, por ter a capacidade de fazer qualquer um acreditar no seu próprio potencial, por confiar e me dar liberdade de executar minhas ideias e por estar disponível para resolver o que fosse preciso. Obrigada por ter estado presente em vários momentos difíceis, mesmo quando o adversário era digno da realeza. Agradeço também a Lilian, que mesmo antes da seleção de doutorado fez todo o possível para que eu me sentisse em casa e esteve durante todo este período torcendo por mim de perto, como uma autêntica bestie. À Dani, agradeço pelo apoio e por ser um exemplo de pesquisadora a quem tive a honra de admirar de perto.

Agora que agradeço aos brilhantes professores que fazem o LIGP ser o que é, chegou a hora de agradecer à chefe do laboratório. Michele, não sei nem por onde

começar. Talvez pelo óbvio e falar que nada seria feito com a qualidade que fazemos no nosso laboratório sem você. Aprendi desde cedo que por trás da fachada briguenta está uma pessoa que acima de tudo se importa com cada um que pisa no E4167. Obrigada por brigar não só por mim, mas por todo mundo. Obrigada por ser essa pessoa justa, companheira, alto astral e sem meias palavras. Agradeço pela aula de ética que recebi de graça nos últimos anos e sobretudo agradeço por ter ganhado uma amiga para vida toda.

E sortuda que sou, o combo “pessoa essencial para o funcionamento do laboratório + amizade” veio em dobro, com Vanêssa. No POP de como fazer uma Vanêssa, o mesmo tanto que você colocar na balança de competência, inteligência e organização, tem que colocar de companheirismo, doçura e otimismo. E uns 500 microlitros de loucura. Mas o tipo de loucura que você quer conviver todo dia, para quem sabe aprender a pensar fora da caixa igual. Obrigada por absolutamente tudo, mas principalmente por continuar sendo uma pessoa positiva e esperançosa, mesmo contra todas as probabilidades.

Mari Cardoso, tirando o dom da vida (que foi minha mãe que me deu), eu acho que o resto eu tenho que agradecer a você. É surreal que tanto conhecimento, generosidade e força estejam concentrados numa só pessoa. Mais surreal é que eu tive a sorte de compartilhar o mesmo espaço-tempo com ela e aprender tudo que ela pacientemente me ensinou. Obrigada por todas as 958 horas de dúvidas tiradas, 674 ideias sugeridas e 1976 piadas ruins que eu contei e que você riu por educação. Porque além de ser uma enciclopédia ambulante, você é uma pessoa excepcionalmente boa. Quando crescer quero ser metade do que você é.

Muito do que aprendi, aprendi pelo simples fato de estar de ouvidos abertos no meio de tanta gente brilhante. Aprendi ouvindo meus colegas de laboratório discutindo o resultado de uma ELISA, discutindo o motivo de um parasito não estar crescendo tão bem, discutindo a influência do pH numa solução, discutindo a complexidade da genômica de um tripanossomatídeo (alô, João Luís). É um privilégio fazer parte deste grupo e poder dizer que eu me tornei doutora não só pela UFMG, mas também pelo LIGP. Obrigada a todos que fazem parte do laboratório, pelos aprendizados e pela convivência maravilhosa.

Eu saí de Aracaju para Belo Horizonte com o coração apertado por morar pela primeira vez longe da minha família. Mal sabia que eu teria a sorte de formar outro tipo de família, que transformou BH do “lugar para o qual eu tive que me mudar” para minha segunda casa. É muito difícil agradecer no mesmo parágrafo a um grupo de pessoas tão diferentes, quando cada um merece uma tese inteira sobre as suas individualidades e sua importância para mim. Mas ninguém quer ler essa carta de amor cafona. Se algum de vocês tiverem interesse nessa versão, me paguem uma cerveja que prontamente declamarei Vinícius de Moraes. Até lá, adiantarei parte dos meus agradecimentos em versos livres que à primeira vista não significam nada, a não ser talvez para quem entenda algo.

Agostino, Dr. Augusto, hi. Posso te chamar de Agostinho? What's going on? Você merece uma Marshall's inteira de bebidinha de carnaval. Alexa disse obrigada e eu também. Anderson, modelo do ICB, patrocinado por Renata, sempre que quero parecer sábia e profunda penso na minha lista de compras, obrigada por me ensinar esta arte secular. E pela amizade. Carol, todas as vezes que bati asinhas foi para você. Continuarei batendo mesmo durante o mercúrio retrógrado e o inferno astral. Ich werde für dich da sein, denn du warst auch für mich. Denise, I had the time of my life, and I never felt this way before. Para você eu mandaria cartas que criariam um paradoxo temporal e dançaria com José Arcádio ou Aureliano, mesmo que o par em questão seja apenas tolerável. Obrigada pela sintonia, pelos olhares cruzados em silêncio e pelas aventuras culinárias compartilhadas. Aaaarroz, bobóra, farofa... Douglas, obrigada por enaltecer minha vida com fatos aleatórios e momentos vergonhosos históricos. Você é sem dúvida o homem que seduziu a vida. Lucas, a banana da terra se come cozida e você tem aula amanhã às 9h no bloco D, não esqueça. Obrigada por me falar da ordem não cronológica da metodologia e da desordem de todo o resto das nossas ideias. No final ninguém entendeu o início, mas me diverti imensamente no processo. Raianna, você é a brefeldina do meu bom humor, a braquiara da minha vazada, o Bing do meu Chandler, could we BE anymore effortless? Com o tempo isso passa, obrigada. Thais, obrigada por ser essa mistura única de Brasil com Egito, Britney com Ilana Casoy, delicadeza com mãozinhas, doçura com revolta, coragem com medo de atravessar a rua. Obrigada por compartilhar tanto amor e dor. Encontrar outro espécime igual talvez só seja possível no seu planeta de origem. Mas acho pouco provável.

Encerro estes agradecimentos pouco ortodoxos para agradecer à minha família original. À minha mãe eu preciso agradecer uma vida inteira de cuidado. Obrigada por me ensinar a prestar atenção aos detalhes, a me comprometer 100% com tudo que eu me propor a fazer, seja um doutorado ou um bolo. Obrigada por achar tudo que eu faço perfeito (mas falta um pouquinho de sal). À minha irmã agradeço por sempre cumprir tão bem seu papel de “modelo de quem eu quero ser”. Você sempre vai ser a mais sagaz, a mais interessante, a mais engraçada, a mais artista. Obrigada por ser minha melhor amiga. À Fernanda, eu agradeço por ter revirado minha vida de cabeça para baixo, da melhor forma possível. Obrigada por ser a melhor pessoa que já existiu na Terra. Finalmente, agradeço a Breno por me surpreender incansavelmente. Por me apoiar incansavelmente. Não existe um dia que eu não me impressione com o seu jeito de pensar, com a sua bondade, com a sua força, com a sua pureza, com o seu amor. Obrigada por ser o melhor companheiro de vida que eu poderia ter. E se você diz que não tem outra família escondida em algum lugar, eu acredito.

“Science needs the light of free expression to flourish.
It depends on the fearless questioning of authority,
and the open exchange of ideas.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

As leishmanioses e a doença de Chagas estão entre as doenças tropicais negligenciadas de maior importância no mundo, afetando milhões de pessoas. Embora o controle através da vacinação seja promissor, nenhuma vacina eficaz está disponível. Neste trabalho, a seleção de candidatos vacinais foi realizada através da técnica de *phage display*. Esta técnica consiste na fusão de peptídeos à superfície do capsídeo de bacteriófagos, produzindo bibliotecas capazes de exibir um amplo repertório de epitopos lineares e conformacionais aleatórios, que podem ser selecionados através da sua afinidade a diversos tipos de ligantes, como anticorpos. Assim, três infecções foram realizadas em camundongos BALB/c utilizando uma cepa de *Leishmania donovani* geneticamente deficiente para o gene da centrina (*LdCEN*^{-/-}), enquanto camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados duas vezes com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. O soro coletado foi avaliado em relação ao aumento da reatividade de anticorpos através do ensaio de ELISA, e as imunoglobulinas de classe G anti-*LdCEN*^{-/-} e anti-*T. cruzi* foram precipitadas e purificadas. Para identificação de peptídeos capazes de se ligarem especificamente aos anticorpos foram realizados ciclos de seleção utilizando bibliotecas de peptídeos de 12, 15 e 17 aminoácidos. Os clones dos fagos mais reativos tiveram seu DNA sequenciado e traduzido em aminoácidos. Estes peptídeos foram sintetizados em membrana de celulose através da técnica de “*SPOT Synthesis*” e de forma solúvel, a fim de investigar sua reatividade contra o soro de animais infectados por *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. Clones de fagos expressando os peptídeos selecionados foram utilizados para imunizar camundongos BALB/c, que tiveram o perfil de resposta imune celular gerado pós vacinação avaliado através de citometria de fluxo. Após infecção desafio por *L. infantum*, *L. amazonensis* e *T. cruzi*, a carga parasitária foi quantificada e possíveis alterações histopatológicas foram avaliadas. O sequenciamento identificou dez peptídeos diferentes, dos quais sete foram selecionados pela IgG anti-*LdCEN*^{-/-} e três pela IgG anti-*T. cruzi*. Todos os peptídeos sintetizados em membrana e de forma solúvel foram reconhecidos por pelo menos um pool de soro avaliado, demonstrando seu potencial como componente vacinal. O esquema de imunização induziu produção crescente e específica de anticorpos, além de estimular um perfil de memória celular, aumento de IFN- γ e redução de IL-10. Foi observada redução de carga parasitária nos animais desafiados por *L. infantum*, *L. amazonensis* e *T. cruzi*, aliada à maior preservação morfológica de todos os órgãos analisados. Como perspectiva, as sequências peptídicas selecionadas serão inseridas no genoma da cepa de *Leishmania major* geneticamente deficiente e reconhecidamente protetora (*LmCEN*^{-/-}). A validação do uso de uma vacina viva como carreadora de sequências peptídicas imunogênicas poderá permitir, em seguida, a inserção de outros genes de interesse. Isto pode levar ao desenvolvimento de uma vacina multicompetente eficaz não só contra as leishmanioses e a doença de Chagas, como também diversas outras doenças, parasitárias e não parasitárias.

Palavras-chave: Leishmanioses, Doença de Chagas, Vacina, *Phage Display*

ABSTRACT

Leishmaniasis and Chagas disease are among the most important neglected tropical diseases in the world, affecting millions of people. Although control through vaccination is promising, no effective vaccine is available. In this work, the selection of vaccine candidates was performed using the phage display technique. This technique consists on fusing peptides to the surface of a bacteriophage capsid, producing libraries able to display a wide repertoire of linear and conformational random epitopes, which can be selected through their affinity to different types of ligands, such as antibodies. Thus, three infections were performed in BALB/c mice using a strain of *Leishmania donovani* genetically deficient for the centrin gene (*LdCEN*^{-/-}), while C57BL/6 mice were infected twice with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Increase in antibody reactivity was evaluated through ELISA assay, and anti-*LdCEN*^{-/-} and anti-*T. cruzi* class G immunoglobulins were precipitated and purified. To identify specifically binding peptides, selection cycles were performed using peptide libraries with 12, 15 and 17 amino acids. The most reactive phage clones had their DNA sequenced and translated into amino acids. These peptides were synthesized in cellulose membrane using the "SPOT Synthesis" technique and also in a soluble form, in order to investigate their reactivity against *Leishmania* spp. and *T. cruzi* sera. Phage clones expressing the selected peptides were used to immunize BALB/c mice, which had their post-vaccination cellular immune response profile evaluated by flow cytometry. After challenge infection by *L. infantum*, *L. amazonensis* and *T. cruzi*, parasite load was quantified and possible histopathological changes were evaluated. Sequencing identified ten different peptides, of which seven were selected by anti-*LdCEN*^{-/-} IgG and three by anti-*T. cruzi* IgG. All peptides synthesized both in membrane and in soluble form were recognized by at least one sera pool evaluated, demonstrating its potential as a vaccine component. The immunization scheme induced increasing and specific antibody production, in addition to stimulating a cellular memory profile, IFN- γ increase and IL-10 reduction. A reduction in parasite load was observed in mice challenged by *L. infantum*, *L. amazonensis* and *T. cruzi*, combined with greater morphological preservation of all analyzed organs. As future perspective, the selected peptide sequences will be inserted into the genome of a genetically deficient and protective *Leishmania major* strain (*LmCEN*^{-/-}). Validating the use of a live vaccine as an immunogenic peptide carrier could then allow the insertion of other genes of interest. This could lead to the development of an effective multicompetent vaccine not only against leishmaniasis and Chagas disease, but also several other pathologies, both parasitic and non-parasitic.

Keywords: Leishmaniasis, Chagas Disease, Vaccine, Phage Display

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> no vetor e hospedeiro vertebrado	19
Figura 2	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> no vetor invertebrado e hospedeiro humano	21
Figura 3	Delineamento experimental geral dos experimentos utilizando animais	45
Figura 4	Esquema de obtenção de soros reativos para utilização em <i>phage display</i>	46
Figura 5	Esquema de imunização de camundongos da linhagem BALB/c	47
Figura 6	Infecções desafio após esquema de imunização	48
Figura 7	Esquema de diluição para titulação de fagos	52
Figura 8	Mapa do vetor pLEXY-ble2.1, ilustrando os sítios de restrição utilizados durante a clonagem.	66
Figura 9	Produção de IgG após infecções sucessivas com <i>LdCEN^{-/-}</i> e <i>T. cruzi</i> Y	71
Figura 10	Curva de parasitemia em camundongos C57BL/6 infectados com 1000 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> Y	72
Figura 11	Produção de IgG após infecções com <i>LdCEN^{-/-}</i> e <i>T. cruzi</i> Y	73
Figura 12	Reatividade de IgG basal e específica para (A) <i>LdCEN^{-/-}</i> e (B) <i>T. cruzi</i> Y	74
Figura 13	Reatividade dos fagos selecionados após ciclos 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3), em comparação ao fago selvagem (FS)	75
Figura 14	Reatividade individual de 95 clones selecionados por (A) IgG anti- <i>LdCEN^{-/-}</i> e (B) IgG anti- <i>T. cruzi</i>	76
Figura 15	Análise da reatividade dos peptídeos específicos para <i>LdCen^{-/-}</i> , sintetizados em membrana de celulose	78
Figura 16	Reatividade dos peptídeos solúveis 1 a 10 frente aos anticorpos gerados por camundongos (n=5) infectados por <i>L. infantum</i> (LI), <i>L. braziliensis</i> (LB), <i>L. amazonensis</i> (LA) ou <i>T. cruzi</i> (TC)	79
Figura 17	Reatividade do pool de peptídeos solúveis 1 a 10 frente ao pool de soros gerados pelas infecções por <i>LdCEN^{-/-}</i> (n=38) e <i>T. cruzi</i> (n=40)	80
Figura 18	Reatividade de IgG total após 1ª (P1, F1, V1), 2ª (P2, F2, V2), 3ª imunização (P3, F3, V3) e 30 dias após 3ª imunização (P30, F30, V30)	81
Figura 19	Reatividade das subclasses IgG1 (A) e IgG2a (B), avaliada 30 dias após a 3ª imunização	82

Figura 20	Perfil celular de linfócitos T auxiliares (CD4) gerado após ensaio de imunização	83
Figura 21	Perfil celular de linfócitos T citotóxicos (CD8) gerado após ensaio de imunização	84
Figura 22	Carga parasitária do (A) baço e (B) fígado de animais imunizados e desafiados por <i>L. infantum</i> , obtida por PCR quantitativa	85
Figura 23	Carga parasitária da lesão cutânea (coxim plantar) de animais desafiados por <i>L. amazonensis</i> , obtida por (A) diluição limitante e (B) PCR quantitativa	86
Figura 24	Evolução do tamanho das lesões cutâneas de animais imunizados e desafiados por <i>L. amazonensis</i> no coxim plantar	86
Figura 25	Parasitemia de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por <i>T. cruzi</i> cepa Y	87
Figura 26	Peso de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por <i>T. cruzi</i> cepa Y, durante fase parasitêmica	88
Figura 27	Carga parasitária do (A) intestino e (B) coração de animais imunizados e desafiados por <i>T. cruzi</i> cepa Y, obtida por PCR quantitativa	88
Figura 28	Fotomicrográfica do corte histológico do baço de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-LI, F-LI, V-LI) por <i>L. infantum</i> , 155 dias pós-infecção	90
Figura 29	Fotomicrográfica do corte histológico do fígado de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-LI, F-LI, V-LI) por <i>L. infantum</i> , 155 dias pós-infecção	92
Figura 30	Score das lesões hepáticas de animais imunizados e desafiados por <i>L. infantum</i> , baseado em quatro graus de inflamação do parênquima	93
Figura 31	Fotomicrográfica do corte histológico do coxim plantar de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-LA, F-LA, V-LA) por <i>L. amazonensis</i> , 13 semanas pós-infecção	95
Figura 32	Fotomicrográfica do corte histológico do coração de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-TC, F-TC, V-TC) por <i>T. cruzi</i> , 60 dias pós-infecção	97
Figura 33	Scores de inflamação no miocárdio (A) e de alterações degenerativas (B) de animais imunizados e desafiados por <i>T. cruzi</i> , baseado em quatro graus de intensidade	98
Figura 34	Fotomicrográfica do corte histológico do intestino de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-TC, F-TC, V-TC) por <i>T. cruzi</i> , 60 dias pós-infecção	100
Figura 35	Score das lesões intestinais de animais imunizados e desafiados por <i>T. cruzi</i> , baseado em quatro graus de inflamação	101
Figura 36	Eletroforese em gel de agarose após digestão dos plasmídeos pLEXYble-2.1 e pUC57 com os pares de enzimas de restrição XbaI + KpnI e BglII + KpnI	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Marcadores de superfície e citocinas utilizadas para caracterizar o perfil imune induzido após ensaio de imunização	60
Tabela 2	Quantidade de DNA tecidual utilizada para amplificação através de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), em nanograma	63
Tabela 3	Peptídeos selecionados pela técnica <i>phage display</i> , através do reconhecimento específico de IgG anti- <i>LdCen</i> ^{-/-} e anti- <i>T. cruzi</i> Y	77
Tabela 4	Correspondência entre peptídeos selecionados e proteínas descritas no proteoma de <i>Leishmania</i> spp.	77
Tabela 5	Tamanhos de bandas esperados (pb) após digestão dos plasmídeos pLEXSY-ble2.1 e pUC57 com os pares de enzimas de restrição XbaI + KpnI e BglII + KpnI	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
aa	Aminoácidos
Abs	Absorbância
BSA	Albumina sérica bovina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DALY	Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTUs	Unidades discretas de tipagem
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
F-MOC	Fluorenil-metil-oxicarbonila
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HRP	Enzima <i>horseradish peroxidase</i>
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
LB	Luria Bertani
mg	Miligrama
mL	Mililitro

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Doenças tropicais negligenciadas.....	18
1.2 Aspectos gerais dos tripanossomatídeos.....	18
1.3 Ciclo de vida.....	18
1.4 Aspectos clínicos.....	21
1.5 Epidemiologia	24
1.6 Tratamento	26
1.7 Desenvolvimento de vacinas e imunidade contra as leishmanioses e doença de Chagas.....	30
1.8 <i>Phage display</i>	36
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Parasitos e manutenção das culturas	44
4.1.1 <i>Leishmania donovani</i> (MHOM/SD/62/1S), <i>L. infantum</i> (MHOM/BR/74/PP75), <i>L. amazonensis</i> (IFLA/BR/67/PH8) e <i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2904)	44
4.1.2 <i>Leishmania donovani</i> e <i>Leishmania major</i> deficientes para o gene da centrina (<i>LdCEN</i> ^{-/-} e <i>LmCEN</i> ^{-/-})	44
4.1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Y)	44
4.2 Produção de antígeno bruto.....	44
4.3 Animais.....	44
4.4 Delineamento experimental.....	44
4.5 Avaliação da reatividade de IgG total para uso em <i>phage display</i>	49
4.5.1 Reatividade de IgG pós infecção com <i>LdCEN</i> ^{-/-}	49
4.5.2 Reatividade de IgG pós infecção por <i>T. cruzi</i>	49
4.6 Obtenção e preparo de IgG basal e específica para uso em <i>phage display</i>	49
4.6.1 Precipitação de imunoglobulinas das amostras de soro.....	49
4.6.2 Purificação de IgG basal e específica para <i>LdCEN</i> ^{-/-} e <i>T. cruzi</i> Y.....	50
4.6.3 Reatividade de IgG basal e específica para <i>LdCEN</i> ^{-/-} e <i>T. cruzi</i> Y	50
4.7 <i>Phage display</i>	50
4.7.1 Bibliotecas de fagos.....	50
4.7.2 <i>Biopannings</i> : ciclos de seleção e amplificação de peptídeos a partir da afinidade por IgG específica	50
4.7.3 Avaliação de reatividade dos fagos selecionados a cada ciclo por ELISA.....	53

4.7.4 Triagem dos peptídeos expressos na superfície de fagos selecionados.....	53
4.8 Obtenção dos peptídeos selecionados	54
4.8.1 Extração de DNA.....	54
4.8.2 Sequenciamento.....	54
4.8.3 Identificação das sequências nucleotídicas.....	54
4.9 Síntese dos peptídeos em membrana de celulose (<i>Spot Synthesis</i>)	55
4.10 Avaliação de reatividade dos peptídeos sintetizados em membrana por <i>immublotting</i>	55
4.11 Síntese de peptídeos solúveis	55
4.12 Avaliação do reconhecimento dos peptídeos selecionados por anticorpos reativos à infecção por <i>Leishmania</i> spp. e <i>T. cruzi</i>	56
4.13 Análise da resposta imune induzida pela vacinação.....	57
4.13.1 Produção de anticorpos específicos	58
4.13.2 Perfil celular.....	58
4.14 Medida da lesão dos camundongos desafiados por <i>L. amazonensis</i>.....	61
4.15 Avaliação da carga parasitária.....	61
4.15.1 Parasitemia	61
4.15.2 Diluição limitante	61
4.15.3 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR).....	62
4.16 Análises histopatológicas	63
4.17 Inserção gênica de sequências de interesse em <i>Leishmania major</i> deficiente para o gene da centrina (<i>LmCEN</i>^{-/-}).....	65
4.17.1 Vetor de expressão pLEXY-ble2.1	65
4.17.2 Preparo de bactérias <i>E.coli</i> competentes	67
4.17.3 Transformação de bactérias <i>E. coli</i>	67
4.17.4 Digestão dos vetores de clonagem (pUC57) e de expressão (pLEXY-ble2.1).....	68
4.17.5 Purificação de banda em gel de agarose	68
4.17.6 Ligação da sequência de interesse ao vetor pLEXY	68
4.17.7 Sequenciamento do vetor pLEXY com insertos de interesse	68
4.17.8 Amplificação do vetor pLEXY com insertos de interesse	68
4.17.9 Linearização do vetor pLEXY e esterilização do DNA	69
4.17.10 Transfecção.....	69
4.17.11 Seleção de <i>LmCEN</i> ^{-/-} recombinante.....	69
4.18 Análises estatísticas	70
5 RESULTADOS	71
5.1 CAPÍTULO 1: Seleção de candidatos vacinais através da técnica de <i>phage</i> <i>display</i>.....	71

5.1.1 Infecções por <i>LdCEN</i> ^{-/-} e <i>T. cruzi</i> Y estimularam produção crescente e significativa de IgG específica	71
5.1.2 Identificação de peptídeos selecionados por <i>phage display</i>	74
5.1.3 Avaliação sorológica de peptídeos selecionados por Phage Display	78
5.2 CAPÍTULO 2: Avaliação de parâmetros imunológicos, parasitológicos e histopatológicos associados à imunização com vacina pan-tripanosomatídeos ...	81
5.2.1 Imunização com vacina induziu produção crescente e significativa de anticorpos	81
5.2.2 Imunização com vacina induziu perfil celular de memória, aumento de IFN- γ e redução de IL-10	82
5.2.3 Imunização com vacina reduziu a carga parasitária das infecções por <i>Leishmania</i> spp. e <i>T. cruzi</i>	85
5.2.4 Análises histopatológicas	89
5.3 CAPÍTULO 3: Perspectivas - Construção de uma vacina viva multicompetente, imunogênica, eficaz e segura	102
Os dados obtidos neste capítulo foram gerados durante período de doutorado sanduíche realizado na <i>Ohio State University</i> (EUA), sob a supervisão do Dr. Abhay Satoskar.....	102
6 DISCUSSÃO	104
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
ANEXOS.....	143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças tropicais negligenciadas

Doenças tropicais negligenciadas são um grupo de infecções de origem viral, bacteriana ou parasitária que afetam mais de um bilhão de pessoas mundialmente. Afligem principalmente países de clima tropical e subtropical em desenvolvimento, especialmente populações pobres marginalizadas de áreas rurais e urbanas (REES *et al.*, 2019). Coletivamente, causam cerca de 750 mil mortes por ano, além de apresentarem elevada morbidade (IHME, 2019). Apesar da complexidade associada à etiologia destas doenças, a Organização Mundial de Saúde as considera preveníveis e tratáveis (WHO, 2017a). Assim, sua manutenção é devido a, sobretudo, políticas de saúde pública falhas ou até mesmo inexistentes que têm como consequência a perpetuação do *status quo*, uma vez que a maioria destas doenças são altamente debilitantes, incapacitantes e estigmatizantes (HOFSTRAAT; VAN BRAKEL, 2016; MARTINS-MELO *et al.*, 2018; MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2016). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde publicou diretrizes para o controle e eliminação das vinte doenças tropicais negligenciadas de maior importância, incluindo dengue, chikungunya, hanseníase, filariose linfática, geohelmintoses, leishmanioses e doença de Chagas, estas últimas as parasitoses mais significativas causadas por protozoários da família Trypanosomatidae (WHO, 2020b).

1.2 Aspectos gerais dos tripanossomatídeos

1.3 Ciclo de vida

Como citado anteriormente, *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* são parasitos heteroxênicos, isto é, completam seu ciclo de vida em hospedeiros invertebrados e vertebrados, dentre os quais alternam diferentes formas evolutivas. *Leishmania* spp. apresenta dois estágios de vida principais. Ao realizar o repasto sanguíneo o flebotomíneo fêmea infectado inocula as promastigotas, formas flageladas, no hospedeiro vertebrado (Figura 1A) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A saliva do inseto é rica em fatores quimiotáticos e imunorreguladores responsáveis pela criação de um ambiente permissivo ao parasitismo. Ali, onde já estão presentes macrófagos residentes da pele, ocorre um intenso influxo de neutrófilos, macrófagos e outras células do sistema mononuclear fagocitário (PETERS *et al.*, 2008; TEIXEIRA

et al., 2005). Nestas células as promastigotas são internalizadas pelo fagossomo, que em seguida funde-se a lisossomos para formar o fagolisossomo (Figura 1B). Como mecanismo de sobrevivência ao novo ambiente, as promastigotas diferenciam-se em amastigotas, formas aflageladas que se multiplicam nos fagolisossomos até a ruptura da célula (Figura 1C). A liberação das formas amastigotas para o meio extracelular faz com que outros fagócitos sejam infectados, afetando diferentes tipos de tecido (Figura 1D) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

O ciclo é concluído no momento em que, durante repasto sanguíneo, o vetor ingere células infectadas com amastigotas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado (Figura 1E-F). No intestino médio do vetor, as células infectadas juntamente ao sangue e à linfa são envolvidas pela matriz peritrófica. Novamente, a mudança de temperatura e pH do meio faz com que o parasito sofra nova transformação morfológica, retornando à forma promastigota (Figura 1G). Após processos de multiplicação e diferenciação, as promastigotas migram para as porções anteriores do aparelho digestivo do flebotomíneo, viabilizando a transmissão das formas metacíclicas ao hospedeiro vertebrado (Figura 1H) (KAMHAWI, 2006).

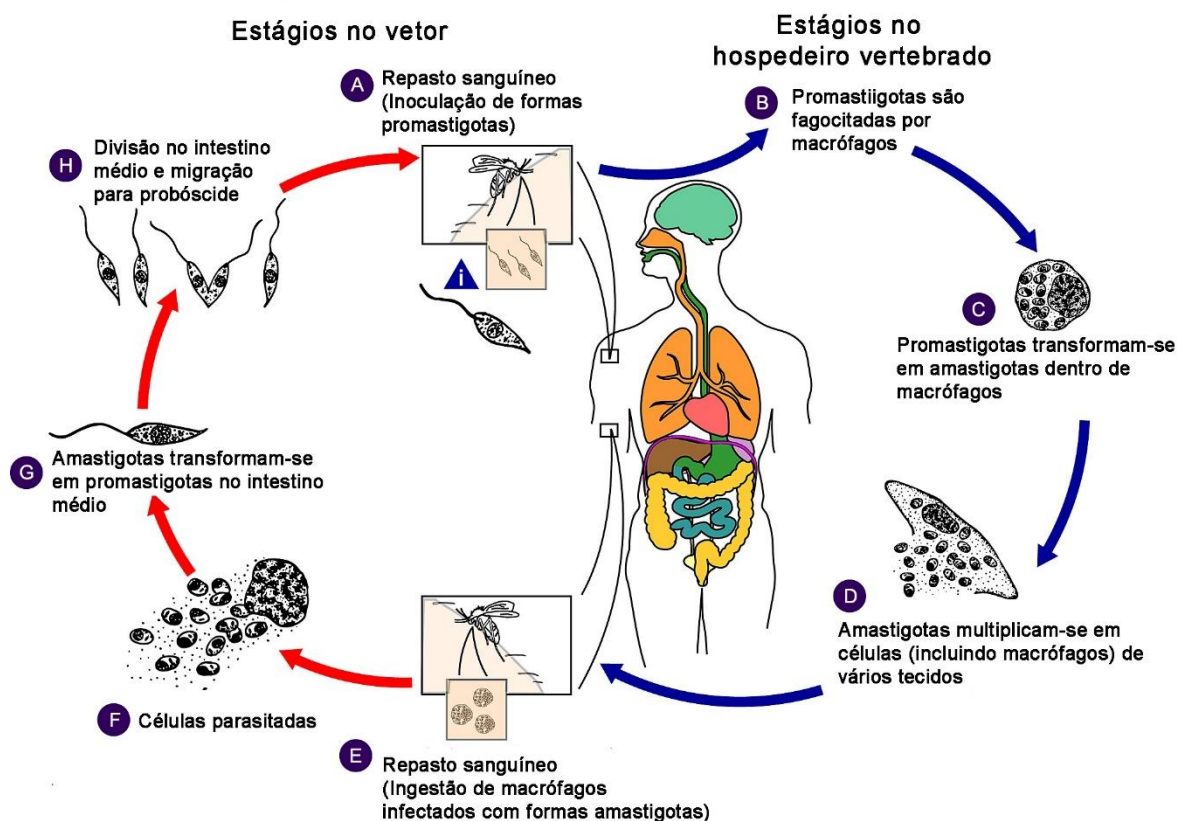


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* no vetor e hospedeiro vertebrado. (A) Flebotomíneo fêmea infectado inocula formas promastigotas, durante repasto sanguíneo. (B) Promastigotas são fagocitadas

por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos residentes na pele. (C) Promastigotas transformam-se em amastigotas dentro de macrófagos. (D) Amastigotas multiplicam-se em células infectadas e afetam diferentes tecidos. (E-F) Flebotomíneo fêmea ingere macrófagos infectados com amastigotas, durante repasto sanguíneo. (G) Ao atingir o intestino médio do flebotomíneo, o parasito diferencia-se em formas promastigotas novamente. (H) As formas promastigotas multiplicam-se e migram para a probóscide. (Adaptado de CDC.gov – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

De maneira análoga ao que ocorre com *Leishmania* spp., *T. cruzi* dispõe de diferentes mecanismos de diferenciação celular que, ao longo da sua história evolutiva, permitiram com que este parasito se adaptasse às diferentes condições fisiológicas encontradas no inseto vetor e nos hospedeiros mamíferos (GONÇALVES *et al.*, 2018). As amastigotas e epimastigotas são as formas replicativas do parasito, enquanto as tripomastigotas são formas infectantes não replicativas, classificadas em metacíclicas ou sanguíneas. Durante o repasto sanguíneo, o vetor triatomíneo infectado libera formas tripomastigotas metacíclicas ao excretar suas fezes e urina. Ao coçar o local da picada, o hospedeiro pode transportar o parasito e infectar-se inadvertidamente (Figura 2A) (BRENER, 1973; FERNANDES; ANDREWS, 2013; TYLER; ENGMAN, 2001). Após entrada no hospedeiro mamífero, as tripomastigotas metacíclicas interagem com diversas células presentes no local da infecção, como fibroblastos, macrófagos e células epiteliais (Figura 2B). A invasão destas células é resultado de processos sucessivos de adesão, interiorização e diferenciação intracelular (SOUZA *et al.*, 2010). Ao invadir a célula hospedeira, as tripomastigotas metacíclicas são contidas dentro do vacúolo parasitóforo, de onde escapam para o citoplasma e se diferenciam em formas amastigotas. Após sucessivas divisões celulares (Figura 2C), as amastigotas transformam-se em tripomastigotas sanguíneas (Figura 2D), que ao romper a célula hospedeira ganham a circulação sanguínea e infectam células de diferentes tecidos. Alternativamente, células infectadas podem ser rompidas precocemente, liberando amastigotas que são capazes de manter o ciclo no interior de células fagocitárias (BRENER, 1973; FERNANDES; ANDREWS, 2013; TYLER; ENGMAN, 2001).

O triatomíneo, ao alimentar-se do hospedeiro mamífero infectado, ingere formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneas (Figura 2E). No intestino médio do vetor, as tripomastigotas transformam-se em epimastigotas, que, após sucessiva multiplicação, aderem-se à cutícula produzida por células do intestino posterior do inseto (Figura 2F-G). Nesta região, as epimastigotas diferenciam-se em

tripomastigotas metacíclicas, que são liberadas da parede intestinal e excretadas pelas fezes e urina do triatomíneo, completando o ciclo do parasito (Figura 2H) (BRENER, 1973; FERNANDES; ANDREWS, 2013; TYLER; ENGMAN, 2001).

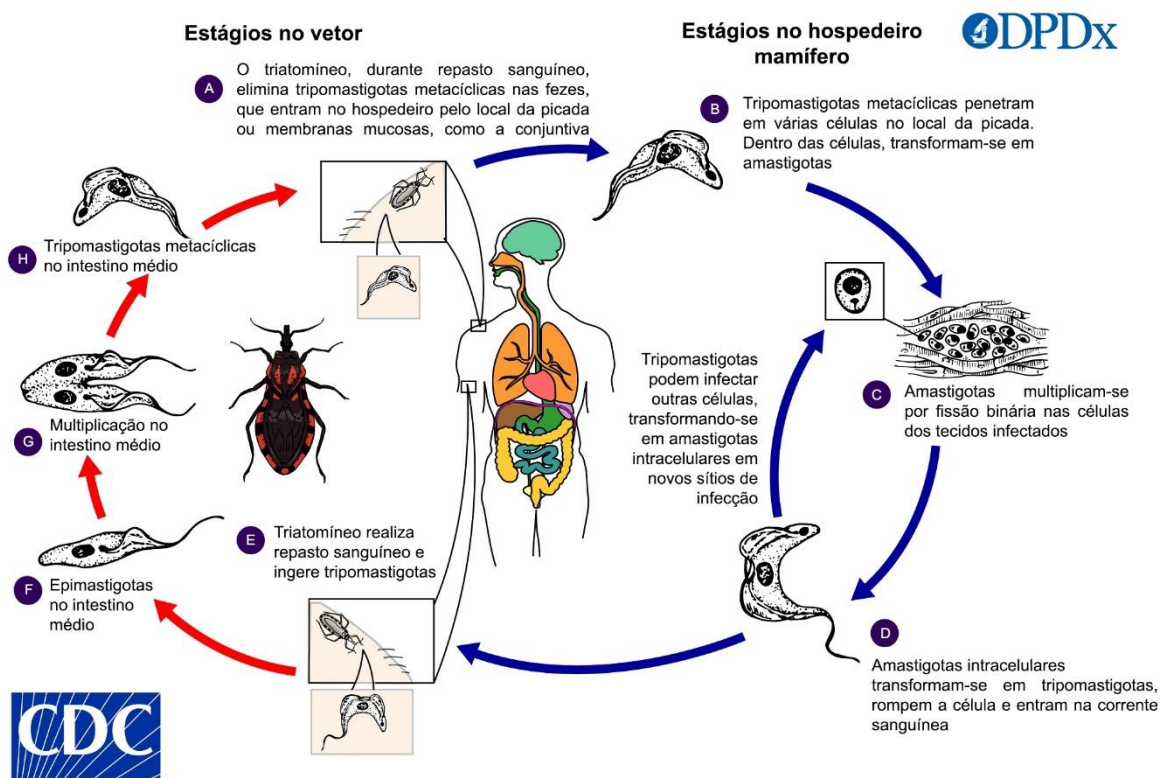


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* no vetor invertebrado e hospedeiro humano. (A) O vetor infectado triatomíneo alimenta-se de sangue e libera tripomastigotas em suas fezes, próximo ao local da picada. Tripomastigotas entram no hospedeiro através do local da picada ou por membranas mucosas intactas. (B) Dentro do hospedeiro, as tripomastigotas invadem células próximas ao local de inoculação, onde diferenciam-se em amastigotas intracelulares. (C-D) As amastigotas multiplicam-se por fissão binária e diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneas que, em seguida, são liberadas na circulação. (E) O vetor é infectado ao alimentar-se de sangue contendo parasitos circulantes. (F) As tripomastigotas ingeridas se transformam em epimastigotas no intestino médio do vetor. (G-H) Os parasitos multiplicam-se no intestino médio e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas infectantes no intestino posterior. (Adaptado de CDC.gov – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>)

1.4 Aspectos clínicos

A infecção por *Leishmania* spp. pode gerar um espectro variado de manifestações clínicas, que estão associadas tanto à espécie infectante como à resposta imune do hospedeiro (KAYE; SCOTT, 2011). Ademais, fatores como idade, estado nutricional, gravidez e coinfeções influenciam a gravidade da doença,

enquanto muitos indivíduos permanecem assintomáticos (BIRNBAUM; CRAFT, 2011). São descritas duas formas principais da leishmaniose, a visceral e a tegumentar, que por sua vez pode apresentar manifestações cutâneas, mucocutâneas ou cutâneas difusa (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A leishmaniose cutânea, considerada a forma mais branda da doença, é caracterizada por úlceras únicas ou múltiplas indolores, de bordas elevadas e bem delimitadas, encontradas em locais expostos do corpo como rosto, braços e pernas, as quais correspondem ao local de picada do flebotomíneo (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A doença geralmente tem curso autolimitante, decorrente do desenvolvimento de imunidade protetora. No entanto, é importante ressaltar que pacientes clinicamente curados podem ser acometidos posteriormente por formas mais graves da doença, como as leishmanioses mucocutânea e cutâneo difusa (CARLSEN *et al.*, 2015; GOTO; LINDOSO, 2012). Apesar de não ser considerada uma infecção grave, as cicatrizes resultantes das ulcerações são desfigurantes, causando estigma social (DAVID; CRAFT, 2009).

A leishmaniose mucocutânea manifesta-se após a metástase do parasito para o tecido mucoso através da via hematogênica ou linfática, causando lesões mutilantes. Os primeiros sintomas apresentados são eritema e ulceração nas narinas, que podem ser acompanhados de linfadenopatia, febre e hepatomegalia. A evolução da doença pode causar perfuração do septo nasal, ulceração do palato, edema gengival e periodontite. Eventualmente ocorre destruição da mucosa oronasofaríngea e da cartilagem presente na face e nas vias áreas superiores, resultando em desfiguração e prejudicando a alimentação e respiração (AHLUWALIA *et al.*, 2004; GOTO; LINDOSO, 2012; KAYE; SCOTT, 2011; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Esta forma da leishmaniose pode ocorrer anos após a cura da lesão inicial, como também pode manifestar-se concomitantemente às lesões cutâneas (KHAMESIPOUR, 2014). Infecções bacterianas secundárias são frequentes, fazendo com que o surgimento de pneumonia seja a principal causa de óbito (WHO, 2010).

A leishmaniose visceral é considerada a forma mais grave da doença. As espécies responsáveis pela infecção, *L. donovani* e *L. infantum*, apresentam tropismo pelos órgãos, de maneira que as formas amastigotas se disseminam pela corrente sanguínea e infectam células fagocitárias presentes no fígado, baço e medula óssea. As manifestações clínicas mais recorrentes são febre, perda de peso, anemia,

caquexia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SAVOIA, 2015). Fatores de risco para progressão da doença incluem má nutrição, fatores genéticos e outras doenças infecciosas. Considerada a segunda causa mais comum de morte por infecção parasitária, a leishmaniose visceral pode ser letal em todos os casos não tratados (GILLESPIE *et al.*, 2016; WHO, 2010).

Assim como as leishmanioses, a doença de Chagas pode se manifestar de diferentes formas. A doença evolui da fase aguda para a crônica, que por sua vez pode ser classificada em indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (PRATA, 2001). A fase aguda geralmente dura cerca de 2 meses e é caracterizada pelo número elevado de parasitos circulantes no sangue. Apesar disso, a maioria dos pacientes permanece assintomática. Quando ocorrem, os principais sintomas da fase aguda incluem inflamação no local da infecção (chagoma de inoculação ou sinal de Romaña; edema palpebral unilateral decorrente da inoculação do parasito na mucosa ocular), febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (BERN, 2015; PRATA, 2001; WHO, 2002). Os sintomas agudos normalmente são autolimitantes, porém a forma aguda grave acomete de 1 a 5% dos indivíduos infectados, que podem apresentar miocardite aguda, efusão pericárdica e meningoencefalite. Estes sintomas desaparecem espontaneamente em 90% dos casos. Embora apresentem sorologia positiva para o parasito, 60 a 70% dos pacientes não apresentam sinais clínicos cardíacos ou digestivos durante o curso da vida, o que caracteriza a forma indeterminada da doença (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A fase crônica determinada geralmente se desenvolve 10 a 30 anos após a infecção inicial, causando comprometimento cardíaco e/ou digestivo que está associado com o desenvolvimento de uma resposta imunológica crônica decorrente da persistência do parasito nos tecidos (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; TARLETON, 2001). A forma cardíaca é considerada a variação mais grave da doença de Chagas, afetando principalmente o sistema de condução elétrica e o miocárdio e resultando em bradicardia, taquicardia, aneurisma apical, tromboembolismo, insuficiência cardíaca e morte súbita (NUNES *et al.*, 2013; RASSI JR; RASSI; LITTLE, 2000). A forma digestiva se desenvolve em 10 a 20% dos casos, afetando esôfago e/ou cólon. Os sintomas da manifestação esofágica podem variar entre quadros leves de acalasia a casos de megaesôfago severo, caracterizado por disfagia, odinofagia, dor epigástrica, regurgitação e perda de peso (DE OLIVEIRA *et*

al., 1998; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Os casos de megacólon podem afetar o segmento sigmoide, reto e/ou cólon descendente, produzindo constipação, distensão abdominal e obstrução do intestino grosso, decorrente da formação de fecaloma ou volvo sigmoide (DE OLIVEIRA *et al.*, 1998; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

1.5 Epidemiologia

Historicamente, sobretudo no novo mundo, as leishmanioses e a doença de Chagas eram zoonoses mantidas por ciclos silváticos, confinando-se ao ambiente rural. No entanto, a invasão das matas silvestres pelo homem, o desmatamento e o processo de urbanização fez com que o ciclo destas doenças se expandisse para os ambientes peridomiciliares e domiciliares das áreas rurais e urbanas (GRADONI, 2018; WHO, 2002, 2010). É importante destacar ainda que diversos fatores ambientais podem alterar o nicho ecológico dos vetores flebotomíneos e triatomíneos, de forma que o aquecimento global pode desempenhar um papel fundamental na disseminação destas doenças para áreas atualmente não endêmicas (BOOTH, 2018).

A transmissão das leishmanioses ocorre quase exclusivamente por via vetorial. Em áreas endêmicas a precarização de moradia e saneamento básico favorece a reprodução de flebotomíneos, que encontram em locais de aglomeração humana condições ideais de proliferação (GRADONI, 2018). No velho mundo as formas visceral e cutânea causadas por *L. donovani* e *L. tropica*, respectivamente, são consideradas antroponoses, uma vez que ocorrem majoritariamente na ausência de reservatórios. No novo mundo, por outro lado, as leishmanioses são consideradas zoonoses, fazendo com que os reservatórios exerçam uma função determinante na manutenção e transmissão destas doenças (GOTO; LINDOSO, 2012; READY, 2014; WHO, 2010). O cão é considerado o principal reservatório da leishmaniose. No Brasil, a eutanásia de cães soropositivos faz parte do programa nacional de controle da leishmaniose visceral, embora diversos estudos contestem a eficácia desta prática (BRASIL, 2014; DANTAS-TORRES *et al.*, 2019).

As leishmanioses são predominantes nas regiões sul da Europa e sudeste da Ásia, leste da África, América Central e América do Sul (WHO, 2021b). A leishmaniose cutânea é endêmica em 90 países, com 95% dos casos ocorrendo nas Américas, na região da bacia Mediterrânea, Oriente Médio e Ásia Central (WHO, 2019a, 2021b). Estima-se a incidência de 600 mil a 1 milhão de casos por ano, principalmente no

Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Líbia, Paquistão, Síria e Tunísia (WHO, 2021b). A forma mucocutânea concentra-se na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2021b). De caráter debilitante e estigmatizante, estas doenças apresentam índice DALY de aproximadamente 295 mil anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (IHME, 2019).

A leishmaniose visceral é endêmica em 79 países e permanece uma das doenças parasitárias com maior mortalidade, provocando cerca de 6 mil mortes em 2019 (IHME, 2019; WHO, 2019b). Além disso apresenta alta morbidade, evidenciada pelo índice DALY de aproximadamente 400 mil anos perdidos por morte prematura ou vividos com incapacidade (IHME, 2019). Estima-se a incidência mundial de 50 a 90 mil casos por ano, apesar destes valores serem subestimados devido às baixas taxas de notificação. A maioria dos casos concentram-se no Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Em 2019, 97% dos casos ocorridos na América tiveram origem no Brasil (WHO, 2021b).

Assim como ocorre com as leishmanioses, casas construídas com materiais inadequados e condições sanitárias escassas são fatores determinantes para a manutenção do vetor da doença de Chagas (WHO, 2002). Em casas feitas de barro, por exemplo, os triatomíneos são frequentemente encontrados em fendas nas paredes e tetos, como também em locais com acúmulo de lixo (MILLS, 2020). Apesar da infecção vetorial não ser eficiente, em áreas endêmicas a exposição contínua ao vetor resulta no aumento de novos casos (BERN, 2015). Após a urbanização da doença, outras vias de transmissão como a congênita, oral e por transfusão sanguínea assumiram papel importante na sua propagação (SANTOS *et al.*, 2020). Apesar dos programas de controle vetorial e triagem de bancos de sangue terem reduzido significativamente a incidência da doença, em algumas regiões esta taxa cresceu (BERN, 2015; MONCAYO, 2003). Enquanto na Bacia Amazônica o número de casos aumentou devido ao consumo de alimentos contaminados com o triatomíneo ou seus dejetos, em áreas do Gran Chaco os vetores tornaram-se resistentes aos inseticidas piretroides (GUREVITZ *et al.*, 2013; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; WHO, 2002).

A doença de Chagas é endêmica em 21 países latino americanos, estendendo-se do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina e Chile. É estimado que 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018;

WHO, 2021a). Em 2019 aproximadamente 10 mil pessoas morreram em decorrência da doença, que além disso apresentou índice DALY de 275 mil anos perdidos por morte prematura ou vividos com incapacidade (IHME, 2019). Em virtude da mortalidade precoce e da sua morbidade, a doença de Chagas afeta diretamente o desenvolvimento econômico das áreas endêmicas, posto que atinge sobretudo a população em idade produtiva (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2007).

Devido a globalização e o aumento da mobilidade humana, a doença de Chagas, assim como as leishmanioses, passou a afetar áreas não endêmicas, principalmente locais que recebem um grande fluxo de imigrantes como os Estados Unidos e Europa (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; RASSI; MARINETTO, 2010; SHAW, 2007; STEVERDING, 2017). A prevalência de latino americanos infectados residindo na Europa é de 4,2% (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2015). Estima-se que haja, ainda, 300 mil indivíduos afetados pela doença nos Estados Unidos, com 30 a 35 mil casos de cardiopatia chagásica e 63 a 315 casos de infecção congênita ao ano (BERN; MONTGOMERY, 2009). No entanto, nestes locais, a doença permanece subdiagnosticada devido à falta de conhecimento dos profissionais de saúde acerca da etiologia de doenças negligenciadas. Assim, sem o diagnóstico correto e controle adequado do paciente chagásico, estes indivíduos podem ser responsáveis pela transmissão da doença nestes locais, seja por meio de transfusões sanguíneas, transplante de órgãos ou pela via congênita (BASILE *et al.*, 2011; STIMPERT; MONTGOMERY, 2010).

1.6 Tratamento

Apesar da extensa busca por novas alternativas para o tratamento das leishmanioses e da doença de Chagas, o arsenal de fármacos utilizados atualmente ainda é limitado (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012). Os principais fármacos para o tratamento das leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, anfotericina B lipossomal, miltefosina e paromicina (ROATT *et al.*, 2020).

Antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio têm sido utilizados desde a década de 40 como fármacos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses (TIUMAN *et al.*, 2011). A administração pode ser realizada via intravenosa e intramuscular para o tratamento visceral ou intralesão para as formas cutâneas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Apesar do mecanismo de ação ainda não estar completamente elucidado, os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos que, após entrada na célula hospedeira, são convertidos para sua forma trivalente ativa. No interior das células infectadas, o antimonial trivalente interfere na ação da enzima tripanotona redutase, comprometendo assim o potencial redutor de tiois pelo parasito, mecanismo este responsável pela manutenção de um ambiente intracelular permissivo a sua multiplicação e sobrevivência (BAIOCCO *et al.*, 2009; WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). Ainda que o tratamento com antimoniais seja efetivo, seu uso é limitado pela necessidade diária de injeções e alta toxicidade associada, o que leva ao abandono do tratamento e seleção de cepas resistentes (ROATT *et al.*, 2020). Os principais efeitos colaterais incluem náusea, vômitos, anorexia e convulsões, além de alterações hepáticas e cardíacas (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Em áreas endêmicas da Índia e do Nepal o surgimento de casos refratários ao tratamento levou à adoção de fármacos alternativos (RIJAL, S *et al.*, 2003; SUNDAR *et al.*, 2000). No entanto, os antimoniais ainda são considerados fármacos de primeira escolha em diversas regiões, incluindo países da América Latina e África Oriental (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017).

A anfotericina B é um antifúngico de largo espectro que também apresenta ação leishmanicida. Na Índia, devido ao surgimento de parasitos resistentes, a anfotericina B passou a ser o fármaco de primeira escolha contra a leishmaniose visceral (ROATT *et al.*, 2020). O tratamento é administrado diariamente via intravenosa, podendo durar de 15 a 45 dias a depender da espécie envolvida na infecção (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). O mecanismo de ação é baseado na diferença de constituição entre as membranas plasmáticas do parasito e do hospedeiro. A anfotericina B age principalmente sobre o ergosterol, presente em abundância na membrana do protozoário, induzindo assim a formação de poros e ocasionando a morte do parasito. Por outro lado, o fármaco também é capaz de se ligar em menor quantidade ao colesterol presente na membrana celular do mamífero, o que resulta em alta toxicidade e no surgimento de efeitos colaterais para o hospedeiro, como febre, hipocalemia, miocardite e nefrotoxicidade (NUSSBAUM *et al.*, 2010; ROATT *et al.*, 2020). Formulações lipossomais da anfotericina B foram desenvolvidas a fim de reduzir sua toxicidade, como o Ambisome, Abelcet e Amphocil (TIUMAN *et al.*, 2011). No entanto, o uso destes fármacos é limitado pelo seu alto

custo e instabilidade à altas temperaturas (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012). A seleção de parasitos resistentes contra a anfotericina parece ser um evento raro. No entanto, casos refratários ao tratamento foram relatados na Índia (PURKAIT *et al.*, 2012; SRIVASTAVA, PANKAJ *et al.*, 2011), França (MORIZOT *et al.*, 2016) e Suíça (EICHENBERGER *et al.*, 2017).

A miltefosina é o único fármaco oral aprovado para o tratamento da leishmaniose (ROATT *et al.*, 2020). Apesar do seu mecanismo de ação não estar completamente elucidado, o composto parece afetar a atividade mitocondrial do parasito e induzir sua morte por apoptose (LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007; PARIS *et al.*, 2004). Devido a facilidade da via de administração e alta porcentagem de cura, a miltefosina passou a ser o fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral no subcontinente indiano (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2018). No entanto, dez anos após sua introdução, a eficácia do tratamento reduziu e índices de recidiva de 10% e 20% foram relatados na Índia e Nepal, respectivamente (RIJAL, SUMAN *et al.*, 2013; SUNDAR *et al.*, 2012). Já em Bangladesh, o índice de cura diminuiu para 85% (RAHMAN *et al.*, 2011). A meia-vida de eliminação longa do fármaco faz com que ele permaneça no organismo em níveis subterapêuticos por semanas. Devido a esta característica, muitos pesquisadores alertaram para o surgimento de cepas resistentes nos locais em que o tratamento fosse extensivamente utilizado (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Recentemente, casos refratários associados a cepas resistentes foram relatados na Índia (SRIVASTAVA, SAUMYA *et al.*, 2017). Os principais efeitos colaterais do tratamento são alterações gastrointestinais, nefro e hepatotoxicidade. Além disso, a miltefosina apresenta efeito teratogênico e não deve ser prescrita em casos de gravidez (SUNDAR; OLLIARO, 2007).

A paromomicina é um antibiótico utilizado para o tratamento das formas cutânea e visceral da leishmaniose, podendo ser administrado de maneira tópica ou via intramuscular (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica pelo parasito, ao ligar-se à subunidade ribossomal 30S (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2008). Apesar de ter demonstrado índice de 94% de cura na Índia em um ensaio clínico, o tratamento utilizando apenas paromomicina apresentou efetividade limitada na África Oriental (HAILU *et al.*, 2010; SINHA *et al.*,

2011). Os efeitos adversos incluem dor no local da injeção, oto e hepatotoxicidade (SUNDAR *et al.*, 2007).

As opções para o tratamento da doença de Chagas permanecem as mesmas desde as décadas de 60 e 70, quando foram lançados o nifurtimox e o benznidazol, respectivamente (BERN *et al.*, 2007). Atualmente, o tratamento é indicado para os casos pediátricos, agudos, congênitos, em casos de reativação da infecção e quando afetam de forma crônica indivíduos com até 18 anos (RASSI JR; RASSI; MARINETTO, 2010; WHO, 2020a). Os índices de cura variam entre 60 a 85% quando o tratamento é realizado na fase aguda (BERN *et al.*, 2007). No entanto, apesar de ser oferecido para pacientes em fase crônica, um estudo randomizado com mais de 2800 pacientes demonstrou que o tratamento com benznidazol não oferece benefícios quanto a prevenção da progressão clínica de cardiopatias causadas pela doença (MORILLO *et al.*, 2015).

Nifurtimox foi o primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento da doença de Chagas, sendo administrado oralmente de três a quatro vezes por dia, por um período de 60 a 90 dias (BERN *et al.*, 2007). O fármaco inibe a síntese de ácido pirúvico e interfere no metabolismo de carboidratos do parasito (BERN, 2015). Os efeitos adversos são frequentes, incluindo sintomas gastrointestinais e neurológicos como anorexia, náusea, vômito, irritabilidade, insônia, desorientação, tremores, parestesias, polineuropatia e neurite periférica (CRISTÓVÃO-SILVA *et al.*, 2019; JACKSON *et al.*, 2010; JACKSON; WYSSA; CHAPPUIS, 2020). Assim, devido à escassez de dados em relação a sua efetividade e segurança, o tratamento com nifurtimox geralmente é preterido em favor do benznidazol (SANGENITO *et al.*, 2019).

O benznidazol é considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento, uma vez que apresenta melhor perfil de segurança e eficácia (SANGENITO *et al.*, 2019; VIOTTI *et al.*, 2009). Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente compreendido, mas o benznidazol é considerado um pró-fármaco que tem seu efeito tripanocida ativado pela ação de enzimas expressas exclusivamente pelo protozoário. A forma reativa do fármaco interfere com a síntese de DNA e inibe o sistema antioxidante do parasito, tornando-o suscetível ao dano oxidativo causado pela célula hospedeira (LOSADA *et al.*, 2021). O tratamento é administrado via oral, de duas a três vezes por dia, por 60 dias (BERN *et al.*, 2007). Os principais efeitos colaterais são dermatológicos, podendo variar de irritação leve a moderada que raramente evolui

para quadros de dermatite grave ou esfoliativa. Outros efeitos adversos relatados durante o tratamento incluem anorexia, astenia, dor de cabeça, distúrbios do sono, neuropatias e aplasia medular (BERN *et al.*, 2007; CRISTÓVÃO-SILVA *et al.*, 2019; JACKSON; WYSSA; CHAPPUIS, 2020; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

1.7 Desenvolvimento de vacinas e imunidade contra as leishmanioses e doença de Chagas

Diversas abordagens têm sido exploradas para o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses e doença de Chagas, desde aquelas constituídas por parasitos mortos ou atenuados até as que são compostas por suas proteínas ou material genético (JAIN; JAIN, 2015; QUIJANO-HERNANDEZ; DUMONTEIL, 2011). Seja qual for o método utilizado, uma vacina ideal contra estes protozoários deve, além de apresentar baixo custo e segurança, induzir uma resposta imunológica responsável pela redução de carga parasitária e morbidade associada a estas enfermidades (COSTA *et al.*, 2011). Assim, compreender os mecanismos de imunidade associados a estas doenças é fundamental para o desenvolvimento de vacinas efetivas.

A imunidade contra *Leishmania* é multifatorial, sendo influenciada tanto pela espécie/cepa infectante, como por aspectos genéticos e/ou nutricionais do hospedeiro (DUNNING, 2009; GABRIEL *et al.*, 2019). Esta interação e suas consequências na progressão da infecção está melhor elucidada no modelo murino, que se baseia no paradigma Th1/Th2 (COSTA *et al.*, 2011). De maneira geral, o fenótipo de resistência está associado ao perfil de resposta Th1 induzido por IL-12 e caracterizado pela produção de IFN- γ e TNF- α tanto por células T auxiliares (CD4⁺) como pelas citotóxicas (CD8⁺) e *natural killer* (NK) (IKEOGU *et al.*, 2020; LIEW; LI; MILLOTT, 1990; PARK *et al.*, 2002). O aumento destas citocinas, além de recrutar células pró-inflamatórias para o sítio da infecção, induz a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos, resultando assim na destruição das amastigotas (ASSREUY *et al.*, 1994; DUTHIE *et al.*, 2012; KUMAR; ENGWERDA, 2014; LIEW; LI; MILLOTT, 1990).

Por outro lado, a suscetibilidade à infecção está associada ao perfil de resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4. Esta citocina atua na supressão de IL-12 e seu receptor, inibindo a polarização da resposta Th1 e consequentemente auxiliando

na manutenção da infecção (LAUNOIS *et al.*, 1995; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; VON STEBUT; UDEY, 2004). Apesar deste paradigma permanecer válido, diversos estudos esclareceram que a promoção da doença não é consequência direta da polarização Th2, mas sim da ausência de uma resposta Th1 efetiva (ANDERSON *et al.*, 2007; ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005). Além disso, outras populações de linfócitos como Th17 e Treg também estão envolvidas na imunidade contra as leishmanioses e desempenham papel importante na geração de resistência e suscetibilidade (LEE *et al.*, 2009; SRIVASTAVA, SAUMYA *et al.*, 2016).

A infecção por *T. cruzi* ativa prontamente a imunidade inata e adaptativa, recrutando macrófagos, células dendríticas, células NK e linfócitos T e B (PARODI; PADILLA; BASOMBRÍO, 2009). Assim como na leishmaniose, a polarização de uma resposta Th1 é responsável pelo aumento de óxido nítrico no interior dos macrófagos e consequente eliminação do parasito (GARG; BHATIA, 2005; TORRICO *et al.*, 1991). A produção de citocinas como IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos T CD4⁺ é responsável não só pela ativação de macrófagos, como também pela expansão de células T CD8⁺ (PARODI; PADILLA; BASOMBRÍO, 2009; QUIJANO-HERNANDEZ; DUMONTEIL, 2011). Estas células desempenham papel citotóxico fundamental através da produção de perforinas, além de contribuírem para a manutenção da inflamação por meio do aumento de IFN- γ durante a fase aguda (DE ALENCAR *et al.*, 2009).

Contudo, esta resposta é focada em algumas proteínas de membrana imunodominantes, como a trans-sialidase e a proteína 2 de superfície de amastigotas. Apresentando alta variabilidade entre cepas diferentes, a imunodominância de poucos epítopos reduz a amplitude e efetividade da resposta imune gerada, podendo contribuir para a evasão do parasito (JUNQUEIRA *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Além disso, a sobrevivência do parasito é decorrente de outros fatores que englobam desde a indução de respostas anti-inflamatórias e reguladoras até a exaustão de células T (ALBAREDA, M CECILIA *et al.*, 2015; BOARI *et al.*, 2018; MATEUS *et al.*, 2019; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012; VOGT *et al.*, 2008). Assim, a resposta imune potente orquestrada pelo hospedeiro não é suficiente para eliminar o parasito durante a fase aguda, fazendo com que a sua permanência nos tecidos seja responsável pela patologia observada na fase crônica (PARODI; PADILLA; BASOMBRÍO, 2009; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012).

As primeiras tentativas de vacinação contra a leishmaniose cutânea são seculares, baseadas no conhecimento empírico de que indivíduos curados de lesões na pele adquiriam proteção (SCHROEDER; AEBISCHER, 2011). A indução de lesões controladas em áreas cobertas do corpo, conhecida como “leishmanização”, permaneceu em uso por mais de 60 anos em diversos países endêmicos (NAGILL; KAUR, 2011). Apesar de ter demonstrado ser a medida de controle mais eficaz contra a leishmaniose cutânea, a falta de padronização, problemas com a segurança vacinal e surgimento de efeitos adversos fizeram com que esta prática fosse interrompida na maioria dos países que adotavam este método (MUTISO *et al.*, 2013). A ideia de uma vacina contra a doença de Chagas surgiu a partir de um raciocínio análogo à leishmanização, quando Blanchard observou que animais que sobreviviam à fase aguda tornavam-se resistentes à reinfeção (RODRÍGUEZ-MORALES *et al.*, 2015).

Assim, o uso de parasitos mortos ou atenuados passou a ser o foco no desenvolvimento das vacinas de primeira geração. Os primeiros ensaios de uma vacina contra leishmaniose utilizando parasitos mortos ocorreram no Brasil, na década de 40, apresentando resultados conflitantes (SRIVASTAVA, SAUMYA *et al.*, 2016). Estes estudos foram retomados a partir da década de 80, explorando diferentes estratégias vacinais (ARMIJOS *et al.*, 2004; MAYRINK *et al.*, 1979; VÉLEZ *et al.*, 2000). No entanto, apesar de apresentar resultados promissores quanto a sua segurança e imunogenicidade, estas vacinas falharam em conferir níveis de proteção satisfatórios (NOAZIN *et al.*, 2009). Vacinas contra a doença de Chagas utilizando parasitos mortos foram testadas em diversos modelos, no entanto os resultados obtidos demonstraram a ineficiência deste tipo de abordagem (GARG; BHATIA, 2005).

Por outro lado, o emprego de parasitos atenuados confere uma grande vantagem no processo de vacinação, uma vez que mimetizam a infecção natural e induzem resposta imune complexa capaz de conferir proteção (DUNNING, 2009; SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2015; SRIVASTAVA, SAUMYA *et al.*, 2016). Esta atenuação pode ser obtida através de cultivo celular longo ou processos químicos e físicos capazes de originar mutagênese (BHAUMIK *et al.*, 2009; DANESHVAR *et al.*, 2014; DATTA *et al.*, 2012; RIOS *et al.*, 2019). Entretanto, apesar deste modelo ser bastante atrativo, as mutações aleatórias e a possibilidade de reversão à virulência tornam este método inviável (SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2015; SELVAPANDIYAN, ANGAMUTHU *et al.*, 2012).

As vacinas de segunda geração passaram, então, a explorar proteínas purificadas ou recombinantes como antígeno vacinal. Associadas a diferentes adjuvantes responsáveis por otimizar sua imunogenicidade (DUTHIE *et al.*, 2012; RAMAN *et al.*, 2012), as vacinas utilizando este método apresentam vantagens como pureza e facilidade de produção em larga escala (DUARTE *et al.*, 2016; RODRÍGUEZ-MORALES *et al.*, 2015). Diversas proteínas purificadas e recombinantes foram avaliadas como candidatos vacinais contra a doença de Chagas, em particular grandes famílias de proteínas de superfície como as trans-sialidases (TS), mucinas, proteínas de superfície associadas a mucina (MASPs), glicoproteína 63s, além de cisteína proteases como a cruzipaina (DUSCHAK; COUTO, 2009; HOFT *et al.*, 2007; RIOS *et al.*, 2019; SERNA *et al.*, 2014). Apesar de muitos candidatos apresentarem resultados promissores em relação a indução de resposta imune e redução de carga parasitária, nenhuma vacina contra a doença de Chagas ultrapassou os testes pré-clínicos (BEAUMIER *et al.*, 2016). Por outro lado, algumas vacinas de segunda geração contra as leishmanioses que alcançaram a fase de ensaios clínicos incluem a LEISH-F1, LEISH-F2, LEISH-F3, Leishmune, Leish-Tec, CaniLeish e Letifend (MOAFI *et al.*, 2019).

A LEISH-F1, uma das primeiras vacinas de segunda geração testada em humanos, é composta pela fusão das proteínas TSA, LmSTI1 e LeIF, associada ao adjuvante MPL-SE. Vários ensaios de fase 1 demonstraram a imunogenicidade e segurança da vacina, além da sua eficácia terapêutica em pacientes com leishmaniose cutânea e mucocutânea (CHAKRAVARTY *et al.*, 2011; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2010). Além disso, a imunogenicidade e segurança destes antígenos foram demonstradas em modelo de leishmaniose visceral canina (FUJIWARA *et al.*, 2005). Baseado nos resultados positivos da fase 1, o mesmo grupo reformulou a vacina, agora denominada LEISH-F2. A reformulação teve como objetivo tornar a proteína mais similar a sua versão selvagem, através da exclusão da cauda de histidina presente na versão anterior. Após ter sua segurança e imunogenicidade avaliadas em ensaios de fase 1, os resultados de fase 2 foram considerados insatisfatórios (GILLESPIE *et al.*, 2016; NCT00982774, 2011; NCT01011309, 2013). A LEISH-F3 é composta pelas proteínas NH36 e SMT fusionadas em tandem, formulada com o adjuvante GLA-SE. Os ensaios de fase 1 demonstraram sua

segurança e imunogenicidade em população sadia dos Estados Unidos e Bangladesh (COLER *et al.*, 2015; NCT01751048, 2017).

A Leishmune foi a primeira vacina contra a leishmaniose canina a ser licenciada para uso no Brasil. É composta pelo ligante de fucose e manose (FML) associado à saponina. Apesar dos ensaios de fase 3 descreverem sua eficácia, sua licença de produção e comercialização foi suspensa devido a insuficiência dos dados apresentados (BORJA-CABRERA *et al.*, 2008; DA SILVA, VALDEMIR O *et al.*, 2001; MAPA, 2014; PARRA *et al.*, 2007). A Leish-tec é composta pela proteína recombinante A2 de *L. infantum*, sendo atualmente a única vacina disponível contra leishmaniose canina no Brasil. Apesar de alguns estudos relatarem resultados promissores, ensaios de campo foram incapazes de demonstrar a eficácia da vacina em cães de áreas endêmicas (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2002; GRIMALDI *et al.*, 2017; REGINA-SILVA *et al.*, 2016; WYLIE *et al.*, 2014). A CaniLeish, licenciada na Europa, é composta por proteínas secretadas e excretadas de *L. infantum* (LiESP) e pelo adjuvante saponina QA-21. Um único ensaio antecedeu o licenciamento da vacina. Os resultados demonstraram que, além de conferir alto grau de proteção contra a infecção, a vacinação foi capaz de prevenir o desenvolvimento de sinais clínicos. Entretanto, ao investigar a eficácia vacinal em um número maior de cães, um estudo mais recente revelou que não houve diferença no percentual de infecção entre cães vacinados e controle (MORENO, JAVIER *et al.*, 2012; OLIVA *et al.*, 2014; VELEZ *et al.*, 2019). A LetiFend, também licenciada na Europa, é composta por uma proteína quimérica formada por cinco fragmentos ribossômicos de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b e LiP0, e histona H2A). O ensaio de fase 3 realizado pré licenciamento demonstrou que a vacina foi capaz de reduzir a taxa de infecção, além de limitar o desenvolvimento de sinais clínicos (CARCELÉN *et al.*, 2009; COTRINA *et al.*, 2018).

Com objetivo de otimizar a especificidade das vacinas compostas por proteínas, as vacinas de terceira geração passaram a explorar o potencial de DNA codificante em sua composição (JAIN; JAIN, 2015). As vantagens deste tipo de abordagem incluem facilidade de produção e administração, estabilidade e potencial imunogênico (GUPTA; GARG, 2015; JOSHI *et al.*, 2014; LIU; WAHREN; HEDESTAM, 2006). Muitos dos antígenos explorados em vacinas de segunda geração contra a doença de Chagas passaram a compor vacinas de DNA. Estas vacinas foram capazes de induzir um perfil de resposta Th1 potente e ativar células T citotóxicas, resultando

em níveis de proteção superiores aos obtidos pela imunização somente com as proteínas (PADILLA; BRANDAN; BASOMBRIÓ, 2017; QUIJANO-HERNANDEZ; DUMONTEIL, 2011).

Embora muitos genes de *Leishmania* tenham sido avaliados quanto à sua eficácia vacinal, apenas um candidato alcançou a fase de ensaios clínicos (MOAFI *et al.*, 2019). Esta vacina utiliza o adenovírus ChAd63 como vetor para expressão do gene KH, constituído pelos antígenos KMP-11 e HASPB de *L. donovani*. Os resultados dos ensaios de fase 1 demonstraram a segurança e imunogenicidade da vacina, que atualmente está sendo avaliada quanto o seu efeito terapêutico em pacientes com leishmaniose dérmica pós-calazar. Os resultados preliminares de fase 2 relataram que a vacina induziu resposta imune celular potente e foi responsável pelo surgimento de efeitos adversos leves (OSMAN *et al.*, 2017; YOUNIS *et al.*, 2021). Apesar de resultados promissores, o nível de proteção obtido por vacinas de DNA ainda é limitado, de maneira que mais estudos devem ser realizados para aumentar sua eficácia (PADILLA; BRANDAN; BASOMBRIÓ, 2017).

Novas metodologias permitiram a otimização das técnicas de manipulação genética, de maneira que diversos grupos passaram a explorar novamente o potencial das vacinas atenuadas (NAGILL; KAUR, 2011; SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2015). Considerada o padrão-ouro para proteção contra patógenos intracelulares, este tipo de vacina é capaz de mimetizar a infecção natural e possivelmente induzir uma resposta protetora mais efetiva (SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2015; SILVESTRE; CORDEIRO; OUAISSI, 2008). Diversos genes importantes para a sobrevivência de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* foram alvos desses estudos, como os genes responsáveis pela expressão de gp72, calreticulina, lyt1, cisteína protease, transportador de bipterina e centrina (BASOMBRIÓ *et al.*, 2002; PAPADOPOULOU *et al.*, 2002; SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2014; SARAVIA *et al.*, 2006; SELVAPANDIYAN, ANGAMUTHU *et al.*, 2001; ZAGO *et al.*, 2008).

A centrina é uma proteína constitutiva do citoesqueleto de eucariotos, responsável pela duplicação e segregação do centríolo. A deleção do gene codificante para esta proteína em *L. donovani* reduz o crescimento das formas amastigotas do parasito, apesar de não interferir com a viabilidade das promastigotas (SELVAPANDIYAN, ANGAMUTHU *et al.*, 2001, 2004). Ao multiplicar-se no interior dos macrófagos, as amastigotas mutantes são incapazes de realizar a divisão celular

de forma adequada, tornando-se multinucleadas e entrando em um processo de morte celular programada (SELVAPANDIYAN, ANGAMUTHU *et al.*, 2004). A imunização com esta cepa, denominada *LdCEN^{-/-}*, foi capaz de conferir proteção contra a infecção por *L. donovani* (BHATTACHARYA *et al.*, 2016; FIUZA *et al.*, 2016; ISMAIL *et al.*, 2017), *L. infantum* (FIUZA *et al.*, 2013, 2015), *L. mexicana* (DEY *et al.*, 2014) e *L. braziliensis* (SELVAPANDIYAN, A. *et al.*, 2009) em camundongos, hamsters e cães. A imunidade gerada pela vacinação foi mediada por uma resposta celular T CD4⁺ e CD8⁺, caracterizada pela produção potente de citocinas pró-inflamatórias IL-12, IFN- γ e IL-17 e redução de IL-10 por macrófagos (BANERJEE *et al.*, 2018; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; SELVAPANDIYAN, A. *et al.*, 2009; SELVAPANDIYAN, ANGAMUTHU *et al.*, 2012). Recentemente, através da metodologia de CRISPR, cepas de *L. major* deficientes para o gene da centrina (*LmCEN^{-/-}*) foram obtidas. Além de evitar o surgimento de lesões em camundongos desafiados por *L. major*, a cepa *LmCEN^{-/-}* foi capaz de reduzir a carga parasitária e induzir uma resposta imune protetora análoga à leishmanização. Ademais, a inoculação de *LmCEN^{-/-}* foi incapaz de gerar patologia em camundongos suscetíveis e imunodeficientes, comprovando a segurança desta vacina (ZHANG *et al.*, 2020).

1.8 Phage display

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Xanthomonas*, *Thermus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Vibrio* (SIDHU; GEYER, 2015). Estes organismos são considerados a forma de vida mais abundante do mundo, com frequência estimada em aproximadamente 10³⁰ partículas. Podem ser encontrados em diversos ambientes, desde nas profundezas do oceano e fontes termais até no trato gastrointestinal de humanos e outros animais (BAKHSINEJAD; SADEGHIZADEH, 2014). Em 1985 George Smith demonstrou que um gene exógeno poderia ser fusionado à sequência gênica da proteína de capsídeo PIII do fago M13, resultando na expressão desta proteína híbrida na superfície viral (SMITH, 1985). Esta técnica, denominada *phage display*, tornou possível a criação de bibliotecas de fagos, compostas por bilhões de fagos capazes de expressar diferentes sequências peptídicas exógenas na sua superfície. Estas sequências podem ser selecionadas através da sua afinidade a diversos tipos de ligantes, como enzimas, anticorpos e receptores de superfície celular (SCOTT, JAMIE K; SMITH, 1990). Um aspecto importante do *phage display* é a ligação entre genótipo e fenótipo, uma vez

que é possível desvendar a sequência peptídica selecionada através da sequência nucleotídica fusionada ao genoma viral (SIDHU, 2000).

Vários tipos de fagos podem expressar peptídeos na sua superfície, como os fagos filamentosos, lambda, T4 e T7. Destes, os fagos filamentosos são o grupo de fagos mais utilizados na técnica de *phage display* e, portanto, melhor descritos na literatura (SIDHU; GEYER, 2015). Também denominados Ff, o grupo pertence à família Inoviridae e inclui os fagos M13, fd e f1, que compartilham cerca de 98% de similaridade genética (AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2016; RAKONJAC *et al.*, 2017). Sua nomenclatura é decorrente do fato de que estes fagos utilizam o pilus F de bactérias como receptor para iniciar a infecção, através da sua interação com a proteína pIII. O DNA viral então é replicado utilizando a maquinaria da célula hospedeira, através de um mecanismo de círculo rolante. Por fim, as novas fitas de DNA viral são encapsuladas pelas proteínas do capsídeo e os fagos são liberados por um processo de extrusão (ARAP, 2005; EBRAHIMIZADEH; RAJABIBAZL, 2014; RODI; MAKOWSKI, 1999). O capsídeo em estrutura de haste abriga seu genoma circular, composto por DNA de fita simples (~6400nt) responsável pela expressão de 11 genes. Estes genes são agrupados de acordo com a sua função, de forma que pIII, pVI, pVII, pVIII e pVIX são componentes proteicos do capsídeo, pII, pV e pX estão envolvidos no processo de replicação do DNA e pI, pIV e pXI são responsáveis pela montagem da partícula viral (HAMZEH-MIVEHROUD *et al.*, 2013; WANG; YU, 2004).

As bibliotecas constituídas por sequências peptídicas aleatórias são as mais utilizadas na seleção por *phage display*, frequentemente auxiliando na identificação de epitopos (AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2016). A maior vantagem deste tipo de abordagem é a sua universalidade, de maneira que a mesma biblioteca pode ser utilizada para diferentes fins (WANG; YU, 2004). Estas sequências aleatórias podem ser clonadas em qualquer proteína do capsídeo, contudo a maioria das bibliotecas são construídas a partir da manipulação genética das proteínas pIII e pVIII (TONELLI; COLLI; ALVES, 2012; WANG; YU, 2004). O genoma viral contém de 3 a 5 cópias da proteína pIII, composta por 406 aminoácidos, enquanto a proteína pVIII, com 50 aminoácidos, apresenta aproximadamente 2700 cópias (ARAP, 2005; WANG; YU, 2004). Devido ao número de cópias, a proteína pVIII geralmente é escolhida para expressão de um número maior de peptídeos pequenos, enquanto pIII expressa um número menor de sequências maiores com maior eficácia (AGHEBATI-MALEKI *et al.*,

2016; HESS; JEWELL, 2019; WILLATS, 2002). É importante destacar, portanto, que as características de expressão inerente a cada proteína estrutural influenciam diretamente na natureza da ligação entre as sequências clonadas e seus ligantes, envolvendo aspectos como afinidade e avidéz (HAMZEH-MIVEHROUD *et al.*, 2013; RODI; MAKOWSKI, 1999; SIDHU; GEYER, 2015).

Inicialmente as sequências exógenas eram fusionadas à porção amino-terminal das proteínas pIII ou pVIII, de forma que todas as cópias da proteína expressavam a sequência. No entanto, esse sistema apresentava limitações em relação ao tamanho das proteínas expressas, uma vez que sequências com maior número de aminoácidos comprometiam a função da proteína do capsídeo à qual estavam ancoradas e, conseqüentemente, a sua exposição a um possível ligante (EBRAHIMIZADEH; RAJABIBAZL, 2014; SIDHU; GEYER, 2015). A fim de contornar este problema, sistemas do tipo 33 ou 88 foram desenvolvidos. Nestas bibliotecas o mesmo fago apresenta dois genes pIII ou pVIII, de forma que uma das proteínas codificadas apresenta o fenótipo selvagem e a outra o fenótipo recombinante (EBRAHIMIZADEH; RAJABIBAZL, 2014; SIDHU; GEYER, 2015; SMITH; PETRENKO, 1997). De maneira semelhante, os sistemas 3+3 ou 8+8 possuem duas cópias da proteína estrutural. Neste caso, entretanto, as duas cópias estão em genomas diferentes, de maneira que a proteína recombinante é expressa por um fagemídeo e a proteína selvagem por um fago auxiliar (EBRAHIMIZADEH; RAJABIBAZL, 2014; SIDHU; GEYER, 2015; SMITH; PETRENKO, 1997). As bibliotecas utilizadas neste trabalho foram desenvolvidas a partir do fago f88-4, um fago filamentoso derivado do fago fd-tet, que utiliza o sistema 88. Estas bibliotecas produzem fagos híbridos que expressam peptídeos exógenos em cerca de 1% a 15% das proteínas pVIII totais (SIDHU; GEYER, 2015).

A técnica de *phage display* pode ser aplicada com inúmeros propósitos diferentes, incluindo a análise de interações proteicas, determinação de especificidade enzimática, mapeamento de epitopos e desenvolvimento de vacinas (EBRAHIMIZADEH; RAJABIBAZL, 2014; HAMZEH-MIVEHROUD *et al.*, 2013). A aplicação deste método na vacinologia explora tanto o emprego do fago como imunógeno carreador de peptídeos antigênicos assim como na identificação de mimotopos, isto é, peptídeos que apesar de possuírem sequência distinta daquela do epitopo nativo são capazes de interagir com o paratopo de maneira análoga, muitas vezes mimetizando epitopos conformacionais (GEYSEN; RODDA; MASON, 1986;

WANG; YU, 2004). As vantagens desta técnica incluem facilidade de produção em larga escala, relativo baixo custo e segurança, uma vez que os fagos são incapazes de promover infecção em células de mamíferos (BAKHSHINEJAD; SADEGHIZADEH, 2014). Ademais, o uso de fagos como carreadores de antígenos é capaz de induzir tanto o braço celular como humoral da imunidade, o que é fundamental para a formação de uma resposta eficaz contra patógenos intra e extracelulares (AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2016; HESS; JEWELL, 2019).

De fato, o *phage display* já foi utilizado para o desenvolvimento de vacinas contra patologias causadas por vírus, bactérias e protozoários (BAZAN; CAŁKOSIŃSKI; GAMIAN, 2012). No entanto, poucos estudos utilizaram a técnica para identificação de candidatos vacinais contra as leishmanioses e a doença de Chagas. Após seleção por *phage display* e triagem por síntese em membrana, dois peptídeos conjugados covalentemente e utilizados como imunógeno foram capazes de induzir resposta Th1 caracterizada pela alta produção de IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10. Além disto, a vacinação com estes peptídeos formulados com adjuvante reduziu edema e carga parasitária em camundongos desafiados por *L. amazonensis* (CHÁVEZ-FUMAGALLI, 2008). A vacinação utilizando um mimotopo sintético formulado em sistema lipossomal induziu resposta mista Th1/Th2 caracterizada pela produção de IFN- γ e IL-10, sendo capaz de conferir proteção significativa de até 98% em camundongos desafiados por *L. infantum* (TOLEDO-MACHADO *et al.*, 2015). Na Tunísia, três peptídeos selecionados através da sua afinidade por promastigotas de *L. major* foram avaliados como imunógenos em modelo murino. Um dos peptídeos conferiu aproximadamente 82% de proteção ao desafio por *L. major*, o que foi creditado à sua interação com a proteína gp63 (RHAJEM; HOUIMEL, 2016). Três mimotopos foram avaliados quanto ao seu potencial protetor após desafio por *L. amazonensis*. A imunização em camundongos induziu altos níveis de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF, enquanto os níveis de IL-4 e IL-10 foram reduzidos. Houve redução de carga parasitária em todos os órgãos analisados, além de diminuição da lesão (DIAS, 2016).

Outros autores avaliaram vacinas compostas por fagos expressando os peptídeos selecionados. Dois clones de fagos selecionados por anticorpos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* foram capazes de induzir resposta Th1 e reduzir a carga parasitária em camundongos imunizados e desafiados por *L. infantum* e *L. amazonensis*. O perfil protetor foi relacionado à produção de IFN- γ por células T

CD8⁺ associado a baixos níveis de IL-4 e IL-10, além de níveis elevados de anticorpos IgG2a específicos (COSTA *et al.*, 2014, 2015). Dois clones foram selecionados através da sua afinidade pela IgG de pacientes portadores de leishmaniose visceral. A imunização com estes fagos conferiu proteção parcial em camundongos desafiados por *L. infantum*, o que foi associado à polarização de resposta Th1 específica (RAMOS *et al.*, 2017). De maneira semelhante, dois clones foram selecionados pelo soro de pacientes com leishmaniose cutânea. Camundongos imunizados com estes fagos produziram resposta imune com perfil Th1, caracterizada por níveis elevados de IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , GM-CSF e produção reduzida de citocinas do perfil Th2. Além disso, a vacinação foi capaz de reduzir a carga parasitária após desafio por *L. amazonensis* (CARVALHO *et al.*, 2018).

Até o momento, nenhum trabalho utilizando *phage display* avaliou o efeito vacinal de mimotopos contra a doença de Chagas. No entanto, alguns estudos exploraram esta técnica para selecionar peptídeos importantes envolvidos em diferentes mecanismos de interação parasito-hospedeiro (KHUSAL *et al.*, 2014; NIBORSKI *et al.*, 2021; SÁENZ-GARCIA *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2015, 2021)., o que pode levar à identificação de novos alvos vacinais.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da alta morbidade e mortalidade, as leishmanioses e a doença de Chagas são consideradas doenças negligenciadas, afetando milhões de pessoas em todo mundo e gerando grande impacto social e econômico. Como ocorre com todas as doenças que afetam as populações mais pobres, o controle destas infecções parasitárias é limitado pela escassez de investimento tanto em políticas públicas de saúde básica como em atividades de pesquisa e desenvolvimento. O tratamento para ambas doenças é baseado em fármacos utilizados há mais de 40 anos, que, além de ter sua eficácia questionada, apresentam diversas limitações desde alta toxicidade até a possibilidade de selecionar parasitos fármaco-resistentes (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; MORAES NETO *et al.*, 2019; SANGENITO *et al.*, 2019).

Portanto, o desenvolvimento de vacinas representa uma abordagem promissora para o controle e eliminação destas doenças, uma vez que induzem efeito duradouro, podem ser administradas de forma profilática e terapêutica e são incapazes de provocar resistência microbiana (NAGILL; KAUR, 2011). Além disso, modelos estatísticos revelam que mesmo vacinas com baixa eficiência apresentam custo benefício superior quando comparadas às estratégias de controle convencionais utilizadas para estas parasitoses (GILLESPIE *et al.*, 2016; RIOS *et al.*, 2019). O principal argumento para o desenvolvimento de uma vacina contra estas infecções é o fato de que hospedeiros que recuperam-se da primo-infecção tornam-se resistentes ou imunes à reinfecção (KHAMESIPOUR *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ-MORALES *et al.*, 2015). Contudo, mesmo sendo considerada uma meta viável e diversos candidatos estejam sendo avaliados em estudos pré-clínicos, não há vacinas efetivas disponíveis atualmente (BEAUMIER *et al.*, 2016; GILLESPIE *et al.*, 2016; SAVOIA, 2015).

Vacinas compostas por poliproteínas demonstram maior potencial para aplicação em massa (BIVONA *et al.*, 2020; REED, STEVEN G.; COLER; CAMPOS-NETO, 2003), especialmente quando consideramos a natureza complexa dos tripanossomatídeos e o polimorfismo genético do sistema imune de mamíferos. Dessa forma, o uso de uma vacina multivalente composta por diferentes antígenos otimiza sua interação com diferentes tipos de MHC (STÄGER; RAFATI, 2012). Ademais, o alto nível de conservação entre os genomas de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* torna possível o desenvolvimento de uma vacina pan-efetiva contra diversas espécies (DUMONTEIL, 2009; KUMAR; ENGWERDA, 2014).

Neste trabalho, a seleção de sequências peptídicas foi realizada através da técnica de *phage display*, mediante o uso de anticorpos reconhecidamente protetores gerados pela imunização com a cepa *LdCEN^{-/-}* e anticorpos gerados após infecção experimental com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Esta técnica é capaz de triar bilhões de candidatos vacinais de maneira eficiente, além de apresentar vantagens como facilidade de manipulação, baixo custo de produção e segurança (AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2016; RODI; MAKOWSKI, 1999). Utilizando esta metodologia, vacinas contra diferentes manifestações da leishmaniose foram capazes de induzir imunidade celular e humoral compatível com um perfil protetor, o que foi demonstrado através da redução de carga parasitária em modelos murinos (CARVALHO *et al.*, 2018; CHÁVEZ-FUMAGALLI, 2008; COSTA *et al.*, 2014, 2015; DIAS, 2016; RAMOS *et al.*, 2017; RHAJEM; HOUIMEL, 2016; TOLEDO-MACHADO; BUENO; *et al.*, 2015).

Assim, considerando o impacto das leishmanioses e da doença de Chagas para saúde pública e a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de controle efetivas, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de uma vacina multicompetente composta por sequências imunogênicas potencialmente protetoras selecionadas por biologia peptídica. Além de prevenir ou reduzir a patologia associada a estas infecções, uma vacina pan eficaz tem o potencial de minimizar as taxas de transmissão em áreas endêmicas e reduzir os custos do sistema de saúde com estas doenças.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma vacina pan-Trypanosomatidae composta por sequências proteicas imunogênicas selecionadas por biologia peptídica.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar epitopos lineares e conformacionais reconhecidos por anticorpos específicos anti-*LdCEN*^{-/-} e anti-*T. cruzi* através da técnica de *phage display*;
- Avaliar a sororreatividade dos peptídeos selecionados frente a anticorpos específicos anti-*LdCEN*^{-/-} e anti-*T. cruzi*;
- Avaliar o perfil de resposta imune induzido pela vacina pan-Trypanosomatidae;
- Determinar o grau de proteção conferido pela imunização de camundongos BALB/c após infecção desafio por diferentes espécies de tripanossomatídeos;
- Descrever os achados histopatológicos presentes em diferentes órgãos de camundongos BALB/c imunizados e desafiados;
- Obter parasitos geneticamente deficientes e transgênicos capazes de expressar as sequências peptídicas de interesse.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitos e manutenção das culturas

4.2 Produção de antígeno bruto

Os antígenos brutos de *Leishmania* spp. e de *T. cruzi* foram obtidos a partir do cultivo de massa de promastigotas e tripomastigotas, respectivamente, em fase log tardia. Os parasitos foram centrifugados 2000g por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em solução de PMSF 0,1mM (SIGMA, EUA) em PBS 1x estéril, utilizando volume necessário para que fosse obtida uma concentração final de 5×10^5 céls/ μ L. Após 15 ciclos de congelamento e descongelamento, a concentração de proteínas do produto final foi obtida através do kit Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras foram mantidas a -80°C.

4.3 Animais

Todos os experimentos em modelo animal foram executados de acordo com os princípios éticos de utilização de animais, visando sobretudo a qualidade sanitária do ambiente, a integridade e o bem-estar físico e mental destes. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme certificado pelo Protocolo nº 65/2018 (Anexo I).

Todos os animais foram adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos durante todo o período experimental no biotério do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Geral

Camundongos fêmeas das linhagens BALB/c (n=164) e C57BL/6 (n=40), com idades de 6 a 8 semanas, foram utilizados para diferentes experimentos ao longo deste trabalho.

Para a seleção de peptídeos através da técnica de *phage display* foi necessária a produção de soros reativos aos parasitos estudados. Para esta finalidade, camundongos BALB/c (n=40) e C57BL/6 (n=40) foram infectados com a cepa *LdCEN*^{-/-} e *T. cruzi*, respectivamente.

Após seleção dos candidatos vacinais, 120 camundongos BALB/c participaram do ensaio de imunização, em que cada grupo recebeu solução salina (PBS, n=40), fago selvagem (FS, n=40) ou fagos vacina (V, n=40). Após imunização, oito animais de cada grupo foram utilizados para avaliar o perfil imune gerado pela vacina, enquanto o restante foi desafiado por *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *T. cruzi*.

Quatro camundongos BALB/c não imunizados desempenharam papel de sentinela e foram infectados com *L. infantum* simultaneamente aos camundongos desafiados com esta espécie.

O delineamento geral de todos os experimentos com animais está ilustrado na Figura 3.

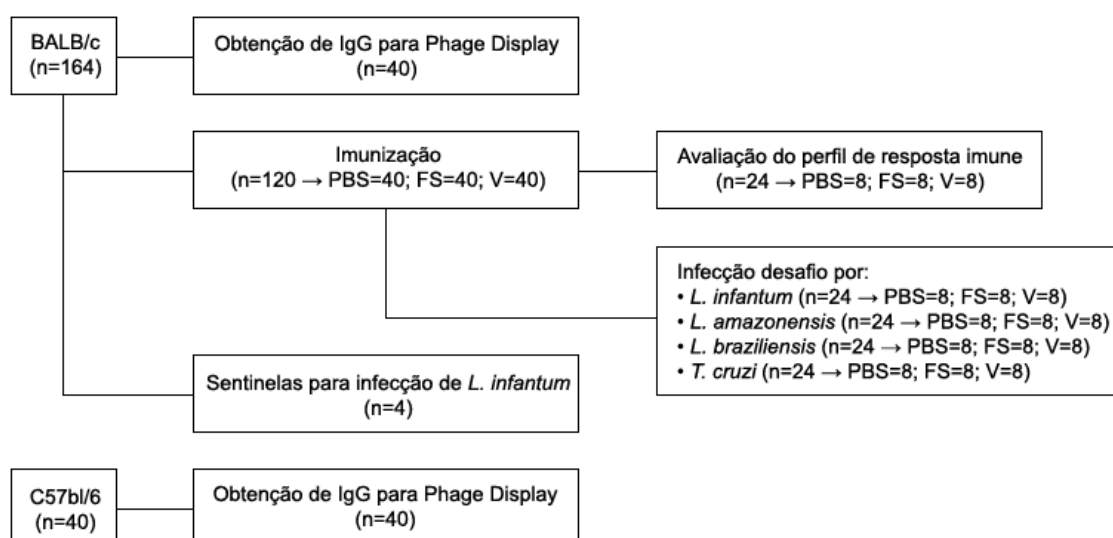


Figura 3. Delineamento experimental geral dos experimentos utilizando animais.

4.4.1.1 Obtenção de soros reativos para utilização em *phage display*

A fim de produzir IgG específica para ser utilizada na técnica de *phage display*, camundongos BALB/c (n=40) foram infectados três vezes com a cepa *LdCEN^{-/-}*, com intervalo de 15 dias. A infecção foi realizada via veia caudal lateral, com inóculo de 1×10^7 formas promastigotas concentradas em um volume final de 50 μ L de PBS 1x estéril. Os animais foram sacrificados após 15 dias da última infecção (Figura 4A).

Foram realizadas duas infecções em camundongos C57BL/6 (n=40) utilizando *T. cruzi*, com o propósito de amplificar e tornar a resposta imune mais específica.

Inicialmente os camundongos foram infectados, via intraperitoneal, com 1000 formas tripomastigotas, em volume final de 100 μ L de PBS 1x estéril. Os animais foram acompanhados durante toda a fase parasitêmica até a entrada na fase crônica da doença, com avaliação diária de mortalidade. Trinta dias após a primeira infecção, os animais foram reinfecados com 10000 formas tripomastigotas, via intraperitoneal, em volume final de 100 μ L de PBS 1x estéril. Os animais foram sacrificados sessenta dias pós-reinfecção (Figura 4B).

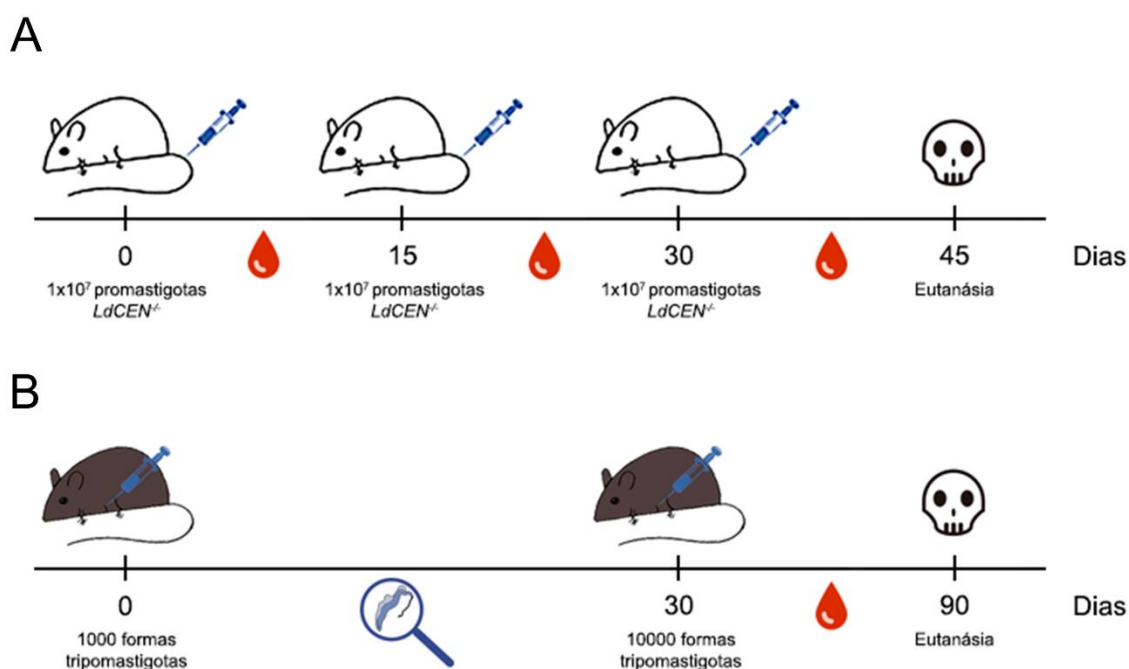


Figura 4. Esquema de obtenção de soros reativos para utilização em *phage display*. A) Infecção de camundongos de linhagem BALB/c com a cepa atenuada *LdCEN*^{-/-}. (B) Infecção de camundongos de linhagem C57BL/6 com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As gotas vermelhas representam coleta de soro para avaliação de aumento de anticorpos.

4.4.1.2 Ensaio de imunização

Camundongos BALB/c (n=120) foram inoculados três vezes com PBS 1x estéril (PBS, n=40), fago selvagem (FS, n=40) ou vacina (V, n=40), isto é, um pool contendo os clones de fagos expressando os peptídeos selecionados pelas IgG anti-*LdCEN*^{-/-} e anti-*T. cruzi* Y. O inóculo (1x10¹⁰ fagos/animal) foi preparado em volume final de 50 μ L de PBS 1x estéril e administrado via subcutânea. Os animais foram imunizados três vezes, com intervalo de 14 dias. O soro foi coletado antes do início, entre cada imunização e após 30 dias da última imunização, a fim de avaliar a resposta imune

induzida em cada grupo. Trinta dias após a última imunização, os animais foram sacrificados para avaliação de resposta imune ou desafiados (Figura 5).

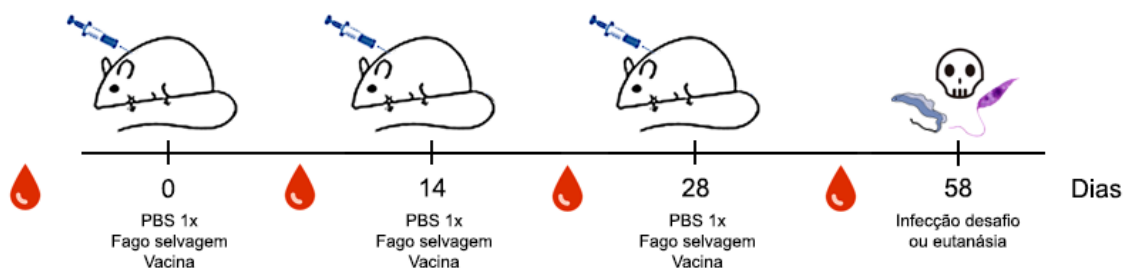


Figura 5. Esquema de imunização de camundongos da linhagem BALB/c (n=120), que receberam três doses de solução salina/PBS, fago selvagem (1×10^{10} fagos/animal) ou vacina (1×10^{10} fagos/animal) no intervalo de 14 dias. Trinta dias após a última imunização, uma parte dos animais foi sacrificada para avaliação do perfil imune (n=24) enquanto o restante (n=96) foi desafiado por diferentes espécies de *Leishmania* e *T. cruzi*.

4.4.1.3 Infecções desafio e coleta de órgãos

Os camundongos BALB que participaram do ensaio de imunização foram desafiados por *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *T. cruzi*. As infecções por *L. infantum* (1×10^6 promastigotas/animal) e *T. cruzi* (1×10^4 tripomastigotas/animal) foram inoculadas intraperitonealmente, em volume final de 100 μ L de PBS 1x estéril. Os animais desafiados por *L. amazonensis* (1×10^6 promastigotas/animal) e *L. braziliensis* (1×10^6 promastigotas/animal) receberam o inóculo via subcutânea, no coxim plantar esquerdo, em volume final de 50 μ L de PBS 1x estéril.

Cada camundongo sentinela para a infecção por *L. infantum* (n=4) foi sacrificado 60, 90, 120 e 150 dias após a infecção. Após confirmação da infecção, o restante dos animais desafiados foi sacrificado 155 dias após a infecção. O baço e fígado destes animais foram coletados para análises de carga parasitária e histopatologia (Figura 6A).

Os camundongos BALB/c desafiados por *L. amazonensis* foram acompanhados semanalmente, a fim de verificar a evolução das lesões cutâneas provocadas pela infecção. Os animais foram sacrificados na 13ª semana pós infecção. A lesão destes animais foi coletada para análises de carga parasitária e histopatologia (Figura 6B).

Os camundongos BALB/c desafiados por *T. cruzi* foram acompanhados por 60 dias pós-infecção, período em que a parasitemia foi realizada diariamente. A seguir,

os animais foram sacrificados e tiveram seu coração e intestino (cólono) coletados para análises de carga parasitária e histopatologia (Figura 6C).

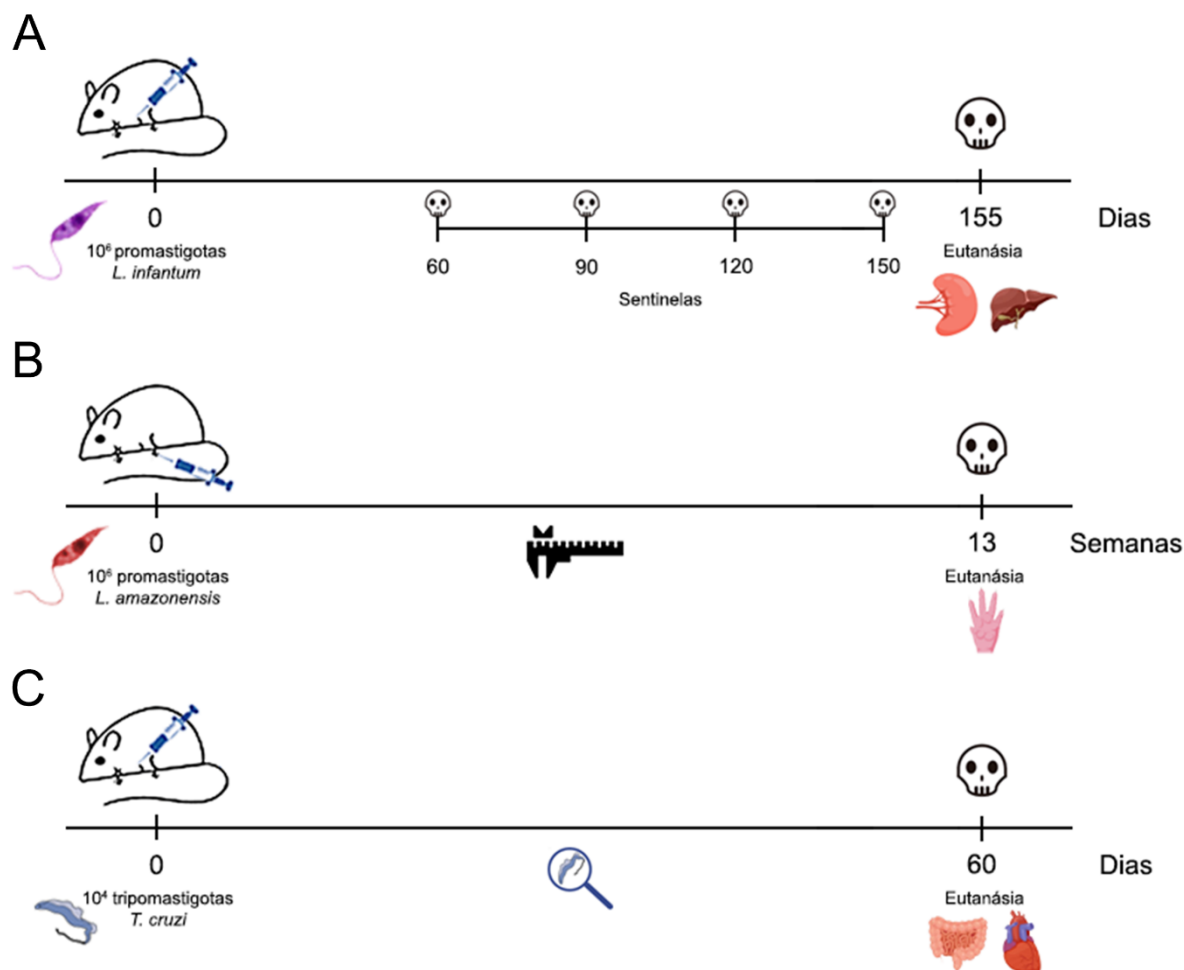


Figura 6. Infecções de desafio após esquema de imunização. Camundongos BALB/c foram desafiados por A) 10⁶ promastigotas de *L. infantum* (n=24), B) 10⁶ promastigotas de *L. amazonensis* (n=24) ou C) 10⁴ tripomastigotas de *T. cruzi* (n=24). Os animais foram sacrificados em diferentes períodos após a infecção e tiveram seus órgãos coletados para análises posteriores.

O desafio por *L. braziliensis* não foi capaz de promover lesão cutânea nos animais infectados. Assim, estes animais foram sacrificados e excluídos do experimento.

A eutanásia de todos os animais foi realizada por sobredose de anestésico (400 mg/kg de cetamina associada a 20mg/kg de xilazina) via intraperitoneal. O sangue foi coletado via intracardíaca com o auxílio de seringa de insulina (26G x 1/2" 0,45x13mm). As amostras foram centrifugadas 5000 g por 10 minutos, a 4°C, e o soro obtido foi mantido a -20°C.

4.5 Avaliação da reatividade de IgG total para uso em *phage display*

4.5.1 Reatividade de IgG pós infecção com *LdCEN*^{-/-}

Um ensaio de ELISA foi realizado a fim de avaliar o aumento da reatividade de IgG total após cada infecção com *LdCEN*^{-/-}. Para isso, uma placa de 96 poços (COSTAR 3590, Corning, EUA) foi sensibilizada com 1 µg/poço de antígeno solúvel de *L. donovani* diluído em tampão carbonato (pH 9,6) e incubada *overnight*, a 4°C. No dia seguinte, os poços foram bloqueados com BSA (Fitzgerald, EUA) 5% por 1h, a 37°C. Em seguida foi adicionado o *pool* de soros obtidos após primeira, segunda e terceira infecção, na diluição de 1:100 em BSA (Fitzgerald, EUA) 5%, por 2h, à temperatura ambiente. Adicionalmente, como controle, foi utilizado um *pool* do soro de animais saudáveis. As amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1:2500 em BSA (Fitzgerald, EUA) 5% por 1h, à temperatura ambiente. O desenvolvimento da atividade enzimática foi obtido pela adição da solução reveladora (20 mg OPD; 10 µL peróxido de hidrogênio; 30 mL de tampão citrato pH 5,0) durante 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida utilizando ácido sulfúrico 4N (Neon, Brasil) e a leitura espectrofotométrica foi executada a 492 nm (VersaMax™ Microplate Reader, Molecular Devices).

O mesmo ensaio foi realizado para verificar a reatividade individual do soro dos camundongos, após a terceira infecção. Os soros de animais que apresentaram reatividade abaixo do valor de corte foram excluídos dos experimentos seguintes.

4.5.2 Reatividade de IgG pós infecção por *T. cruzi*

A reatividade do *pool* de soros após primeira e segunda infecção, assim como a reatividade individual de soros de camundongos reinfectedos experimentalmente por *T. cruzi* Y foi avaliada por ELISA, conforme descrito no subitem 4.5.1. Neste caso, para sensibilizar as placas, foi utilizado 1 µg/poço do antígeno bruto de *T. cruzi*. Um *pool* de soro de animais saudáveis, com produção basal de anticorpos, foi utilizado como controle.

4.6 Obtenção e preparo de IgG basal e específica para uso em *phage display*

4.6.1 Precipitação de imunoglobulinas das amostras de soro

Os *pools* de soro positivos e basais foram precipitados através da adição de solução supersaturada de Sulfato de Amônio, na proporção de 1:1, em agitação,

overnight, a 4°C. Em seguida, a amostra foi armazenada em uma membrana de diálise (12000 a 14000 Dalton MWCO), imersa em PBS 100x diluído, em agitação, por 48h, a 4°C.

4.6.2 Purificação de IgG basal e específica para *LdCEN*^{-/-} e *T. cruzi* Y

Após diálise, os *pools* de soro positivos e negativos foram filtrados em coluna de Proteína A-Sepharose 4B (Sigma, EUA) e mantidos em agitação, *overnight*, a 4°C. A eluição das IgGs da coluna foi feita a partir da adição de solução ácida de glicina (pH 2,8). Utilizando membrana de diálise (12000 a 14000 Dalton MWCO) imersa em PBS 100x diluído, o pH das amostras foi neutralizado durante 24h. A concentração de proteínas foi obtida através do kit Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras foram mantidas a -20°C.

4.6.3 Reatividade de IgG basal e específica para *LdCEN*^{-/-} e *T. cruzi* Y

A reatividade de IgG basal e específica para *LdCEN*^{-/-} e *T. cruzi* Y foi avaliada por ELISA, conforme descrito no subitem 4.5.1. Neste caso, para sensibilizar as placas, foi utilizado 1 µg/poço do antígeno solúvel de cada parasito. Como amostra, foram avaliadas concentrações crescentes (12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL) de todas as IgGs purificadas anteriormente.

4.7 Phage display

4.7.1 Bibliotecas de fagos

As bibliotecas de fagos utilizadas neste trabalho foram construídas a partir do vetor f88-4, capaz de expressar peptídeos aleatórios de 12 (XCX₈CX), 15 (X₁₅) e 17 (X₈CX₈) aminoácidos. Estas bibliotecas descritas previamente por Bonnycastle (BONNYCASTLE *et al.*, 1996) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui.

4.7.2 Biopannings: ciclos de seleção e amplificação de peptídeos a partir da afinidade por IgG específica

Os fagos expressando peptídeos de interesse foram obtidos após dois a três ciclos de seleção e amplificação em *Escherichia coli* K91.

4.7.2.1 Seleção de fagos expressando peptídeos reconhecidos por IgG específica

Primeiramente, a fim de minimizar a inespecificidade da seleção, uma placa de vinil de 96 poços (COSTAR 2595, Corning, EUA) foi sensibilizada com 50 µg/mL de

IgG basal e mantida sob agitação, por 48h, a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada com solução de TBS-Tween 0,05% e bloqueada com solução de BSA 3%, por 2h a 37°C. Foi feito um *pool* utilizando as três bibliotecas de fagos, numa concentração final de 2×10^{11} TU/mL. Após 48h de incubação, o sobrenadante (composto por fagos que não apresentaram afinidade pela IgG basal) foi coletado e incubado em uma nova placa, desta vez sensibilizada com a IgG específica para *LdCEN*^{-/-} ou *T. cruzi* Y. A placa foi mantida em agitação por 24h, a 4°C. A eluição dos fagos foi efetuada a partir da adição de solução ácida de glicina (pH 2,2) e a neutralização do pH, através da solução de Tris-base (pH 9).

4.7.2.2 Amplificação em *E. coli* K91 e precipitação dos fagos

A amplificação dos fagos foi realizada através da adição dos fagos com pH neutralizado em uma cultura de *E. coli* K91 em meio LB (OD 600 nm = 1,8), a 180 rpm, *overnight*, a 37°C. Para selecionar as bactérias infectadas pelos fagos foi adicionada ao meio 10% de tetraciclina (Sigma, EUA) a 20 mg/mL. No dia seguinte, o meio com as bactérias e os fagos amplificados foi distribuído em tubos falcon (Olen, China), que foram centrifugados a 2000 g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente a 2000 g por 15 minutos, a 4°C, para garantir que todo *pellet* de bactéria fosse removido. Por fim, o sobrenadante contendo apenas os fagos foi precipitado com 15% de solução de PEG 8000 (Sigma, EUA) e mantido *overnight* a 4°C.

4.7.2.3 Obtenção e titulação dos fagos

Após precipitação, os tubos falcon contendo os fagos foram centrifugados a 8200 g por 55 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de fagos ressuscitado com 3 mL de TBS (50mM, NaCl 150mM pH 7,5). Em seguida, os fagos foram centrifugados a 15500 g por 20 minutos, a 4°C, para eliminar os remanescentes celulares. O sobrenadante foi mantido a -20°C. Para titulação, 10 µL foi retirado e diluído de acordo com o esquema abaixo (Figura 7).

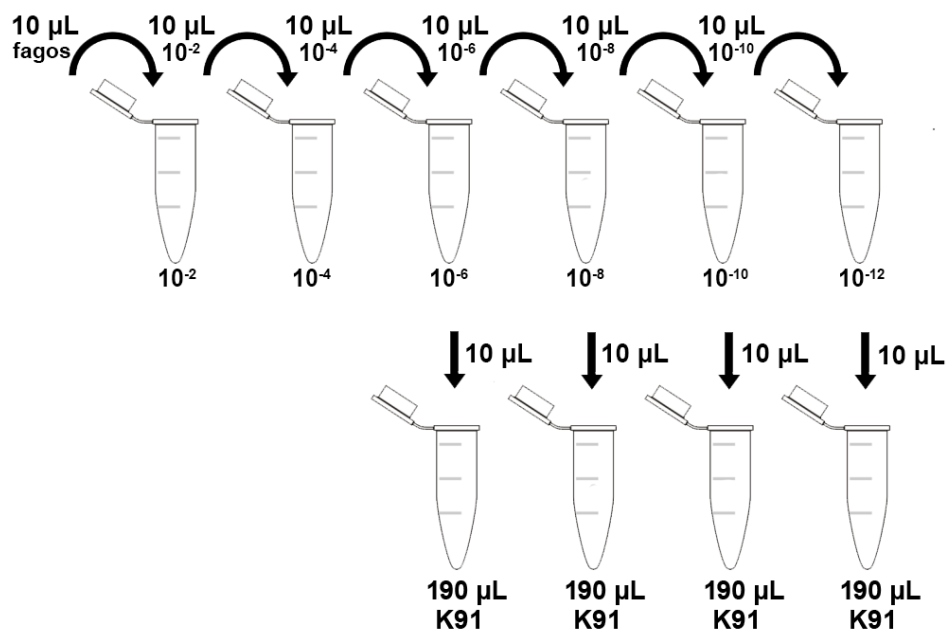


Figura 7. Esquema de diluição para titulação de fagos. Na parte superior da figura, 10 µL de fagos obtidos ao final do ciclo de seleção são diluídos de forma seriada (10^{-2} a 10^{-12}) em meio LB. Após diluição, 10 µL das diluições 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-12} são utilizadas para infectar 190 µL de *E. coli* K91 (OD 600 nm = 1,8). Após período de incubação, todo volume é plaqueado em meio LB sólido acrescido de 10% de tetraciclina a 20 mg/mL.

Dez microlitros dos fagos correspondentes às diluições 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-12} foram utilizados para infectar 190 µL de uma cultura de *E. coli* K91 (OD 600nm = 1,8), durante 30 minutos, a 37°C. Em seguida, todo o volume foi plaqueado em meio LB sólido acrescido de 10% de tetraciclina a 20 mg/mL. Como controle negativo, 200 µL de bactérias não infectadas foram plaqueados em meio LB sólido acrescido de tetraciclina. As placas foram incubadas *overnight*, a 37°C. O cálculo do número de fagos foi calculado de acordo com a fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de fagos} = N^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{fator de diluição} \times 100$$

Os fagos obtidos ao final de cada ciclo foram utilizados na concentração de 2×10^{11} TU/mL nos ciclos seguintes. A fim de aumentar a especificidade da seleção, foram utilizadas concentrações gradativamente menores da IgG específica de *LdCEN*^{-/-} ou de *T. cruzi* Y a cada ciclo. No segundo, as placas de vinil foram sensibilizadas com 30 µg/mL de IgG e no terceiro, com 10 µg/mL.

4.7.3 Avaliação de reatividade dos fagos selecionados a cada ciclo por ELISA

A fim de avaliar aumento da reatividade dos fagos selecionados a cada ciclo, uma placa de 96 poços (COSTAR 3590, Corning, EUA) foi sensibilizada com 1 µg/poço da IgG específica de *LdCEN*^{-/-} ou de *T. cruzi* Y e mantida *overnight* a 4°C. Em seguida, a placa foi bloqueada com BSA 5% por 1h, a 37°C. Os fagos obtidos em cada ciclo foram incubados na concentração de 2x10¹¹ TU/poço por 2h, à temperatura ambiente. Como controle foi utilizada a mesma concentração do fago selvagem. Para verificar o reconhecimento IgG-fago foi utilizado o anticorpo anti-fago M13 conjugado à peroxidase (Sigma, EUA), na diluição 1:5000. O desenvolvimento da atividade enzimática foi obtido pela adição da solução reveladora (20 mg OPD; 10 µL peróxido de hidrogênio; 30 mL de tampão citrato pH 5,0), durante 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida utilizando ácido sulfúrico 4N (Neon, Brasil) e a leitura espectrofotométrica foi executada a 492 nm (VersaMax™ Microplate Reader, Molecular Devices).

4.7.4 Triagem dos peptídeos expressos na superfície de fagos selecionados

Após seleção, os fagos obtidos foram plaqueados em meio LB sólido acrescido de 10% de tetraciclina a 20 mg/mL e incubados *overnight*, a 37°C. Noventa e cinco clones foram selecionados aleatoriamente e incubados em 1,5 mL de meio LB acrescido de 10% de tetraciclina a 20 mg/mL, em uma placa *deepwell* estéril, a 180 rpm, *overnight*, a 37°C. Como controle, uma colônia infectada com o fago selvagem foi incubada no 96º poço. Simultaneamente, uma placa de 96 poços (COSTAR 3590, Corning, EUA) foi sensibilizada com 0,5 µg/poço de IgG específica para *LdCEN*^{-/-} ou *T. cruzi* Y e incubada *overnight*, a 4°C.

Em seguida, a placa *deepwell* foi centrifugada a 2000 g por 30 minutos, a 4°C. Cinquenta microlitros do sobrenadante de cada poço, contendo clones de fagos individualmente amplificados, foram coletados. Para cada 50 µL de sobrenadante foram adicionados 50 µL de BSA 3% e os 100 µL finais foram incubados na placa de ELISA, previamente bloqueada por 2h com BSA 3%, à temperatura ambiente. O anticorpo anti-fago M13 foi incubado na diluição de 1:5000 em BSA 3%, por 1h e 30 minutos, à temperatura ambiente. O desenvolvimento da atividade enzimática foi obtido pela adição da solução reveladora (20 mg OPD; 10 µL peróxido de hidrogênio;

30 mL de tampão citrato pH 5,0) durante 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida utilizando ácido sulfúrico 4N (Neon, Brasil) e a leitura espectrofotométrica foi executada a 492nm (VersaMax™ Microplate Reader, Molecular Devices).

Todos os clones foram amplificados e aqueles que apresentaram maior reatividade (em comparação com a absorbância referente ao controle) foram precipitados, de acordo com o que foi descrito no subitem 4.7.2.2. O DNA destes clones foi extraído e enviado para sequenciamento. Todos os clones foram preservados com *E. coli* em glicerol, a -80°C.

4.8 Obtenção dos peptídeos selecionados

4.8.1 Extração de DNA

O DNA dos clones de fagos selecionados foi extraído utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração final foi medida por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, EUA).

4.8.2 Sequenciamento

As amostras de DNA foram sequenciadas pela empresa Macrogen (Seoul, Coreia do Sul), através do serviço de sequenciamento padrão. Foi utilizado o primer M13 R 5'-3' TCGGCAAGCTCTTTTAGG.

4.8.3 Identificação das sequências nucleotídicas

Considerando que o sequenciamento foi realizado utilizando um primer reverso, a ferramenta *Reverse Complement* (disponível em www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) foi utilizada para obter as sequências reversas e complementares de nucleotídeos. Em seguida as sequências nucleotídicas de interesse, referentes aos peptídeos selecionados, foram traduzidas através da ferramenta ExPASy *translate* (disponível em web.expasy.org/translate), a partir da primeira janela de leitura.

As sequências peptídicas foram analisadas com a ferramenta BLASTp, a fim de compará-las a sequências proteicas descritas nos proteomas de *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. Foi utilizado o banco de dados de sequências proteicas não redundantes, para os organismos *Leishmania* (taxid:5658) e *Trypanosoma cruzi* (taxid: 5693). Os parâmetros padrão do algoritmo utilizado (blastp) foram mantidos.

4.9 Síntese dos peptídeos em membrana de celulose (*Spot Synthesis*)

Os peptídeos selecionados foram sintetizados em membrana de celulose, utilizando o aparelho ResPep SL (Intavis, Alemanha) e o programa MultiPep (Intavis, Alemanha), de acordo com protocolo proposto por Frank (FRANK, 1992). Brevemente, nesta técnica foram utilizados derivados de aminoácidos contendo um grupo protetor da região N-terminal (*Fluorenil-metil-oxicarbonila* ou F-MOC). Este grupo protetor previne a polimerização dos aminoácidos e garante o acoplamento correto de um aminoácido por vez na cadeia peptídica sendo formada. O grupo F-MOC foi removido pela adição de uma solução de 25% de 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF). Em seguida, os aminoácidos foram ativados pela adição de 1,1 M de diisopropilcarbodiimida (DIC)/Oxyma e depositados na membrana. Os resíduos de amina livres foram acetilados pela adição de solução de anidrido acético em 20% DMF. Essas etapas repetiram até todos os aminoácidos serem acoplados. Ao final da síntese, a membrana foi lavada com uma solução de 95% ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% tri-isopropilsilano (TIPS) e 2,5% água, a fim de remover os grupos protetores presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos.

4.10 Avaliação de reatividade dos peptídeos sintetizados em membrana por *immublotting*

A reatividade dos peptídeos sintetizados em membrana foi avaliada através da técnica de *immunoblotting*. Inicialmente, a membrana foi incubada com solução de bloqueio (BSA 5%, sacarose 4% em PBS 1x) e mantida em agitação, *overnight*, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBS-Tween 0,1% e incubada com *pool* de soro de camundongos saudáveis, reativo para *LdCEN*^{-/-} ou reativo para *T. cruzi* Y, na diluição de 1:500, em PBS-Tween 0,1%, por 2h. Após três novas lavagens, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de (1:10000), em PBS-Tween 0,1%, por 1h. Após lavagens, a imunorreatividade foi detectada utilizando o substrato Luminata™ Forte Western HRP (Millipore, EUA) e a reação de quimiluminescência foi visualizada através do aparelho ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare).

4.11 Síntese de peptídeos solúveis

Os peptídeos selecionados também foram sintetizados sob a forma solúvel, utilizando-se, para tal, um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina)

conforme descrito por Merrifield, com algumas modificações (MERRIFIELD, 1963). Em resumo, 54mg da resina (Rink Amide-40 mM) foi colocada em um tubo de síntese e seu grupamento F-MOC foi liberado pela adição de 20% piperidina em dimetilformamida (DMF). Após três lavagens realizadas com auxílio de uma bomba à vácuo, o tubo de síntese foi lavado novamente com DMF. O acoplamento dos aminoácidos iniciou-se em seguida. O primeiro aminoácido a ser acoplado é ligado pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amina da resina, formando uma ligação peptídica. Para cada 160 mM de aminoácido, foram acrescentados 21,6 mg de hidroxibenzotriazol (HOBt) e 25 mL de diisopropilcarbodiimida (DIPC), reagentes estes que permitem a ativação da função COOH dos aminoácidos F-MOC. Com DMF suficiente para cobrir toda a resina, o tubo permaneceu sob agitação constante por 3 horas, a 37°C. Após, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado com auxílio de uma bomba a vácuo e a resina lavada três vezes com DMF. O grupamento amina deste primeiro aminoácido acoplado foi desprotegido lavando-se a resina com uma solução de 20% em DMF. O segundo aminoácido, com seu grupamento amina protegido, foi adicionado ao tubo de síntese juntamente com HOBt e DIPC e este foi processado exatamente como o anterior. Este ciclo foi repetido até que todos os aminoácidos do peptídeo fossem acoplados. Após o término dos ciclos, o último aminoácido foi desprotegido como os anteriores e a resina lavada com diclorometano. O peptídeo foi dissociado da resina pelo uso de uma solução de clivagem, contendo 2,5% de *b*-mercaptoetanol e 2,5% de água, num volume final de 5 mL de TFA. A solução contendo os peptídeos foi coletada com auxílio de uma bomba a vácuo e os produtos da síntese foram precipitados com éter gelado, *overnight*, a 4°C. O tubo foi lavado e centrifugado três vezes a 1100 g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspenso em água. Em seguida, o peptídeo foi liofilizado e purificado em sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Finalmente, a massa molecular de cada peptídeo foi verificada através da técnica MALDI-TOF-TOF, utilizando como matriz o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico.

4.12 Avaliação do reconhecimento dos peptídeos selecionados por anticorpos reativos à infecção por *Leishmania* spp. e *T. cruzi*

A fim de verificar se os peptídeos selecionados eram reconhecidos por anticorpos produzidos em resposta às infecções por *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, dois ensaios de ELISA foram realizados.

O primeiro buscou analisar o reconhecimento individual de cada peptídeo frente ao soro de camundongos experimentalmente infectados, a fim de elucidar se os peptídeos são reconhecidos predominantemente por uma espécie. Os soros utilizados neste experimento foram obtidos da soroteca do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos. O segundo avaliou o reconhecimento do pool de todos os peptídeos selecionados pelo soro de animais infectados por *LdCEN*^{-/-} e por *T. cruzi* Y, em fase crônica. Dessa maneira, este segundo ensaio teve como objetivo revelar o possível reconhecimento desencadeado pela vacinação com estes peptídeos. Ambos ensaios obedeceram ao mesmo protocolo, com exceção às fases de sensibilização e incubação de amostras. As diferenças estão expressas a seguir através das numerações (1) e (2), referentes ao primeiro e segundo ensaio.

De maneira geral, uma placa de 96 poços (COSTAR 3590, Corning, EUA) foi sensibilizada com (1) 0,5 µg/poço de cada peptídeo solúvel ou (2) 0,5 µg/poço do pool de todos os peptídeos diluído em tampão carbonato (pH 9,6) e incubada *overnight*, a 37°C. No dia seguinte, os poços foram bloqueados com BSA (Fitzgerald, EUA) 5% por 1h, a 37°C. Em seguida, foi adicionado (1) soro de camundongos C57bl/6 (n=5) previamente infectados com *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ou *T. cruzi* ou (2) pool de soro de camundongos BALB/c infectados três vezes com *LdCEN*^{-/-} (n=40) ou *T. cruzi* Y (n=40). Todos os soros foram utilizados na diluição de 1:100 em BSA (Fitzgerald, EUA) 5% e incubados por 1h, a 37°C. Como controle, foram adicionados soros de animais saudáveis. As amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1:2500, em BSA (Fitzgerald, EUA) 5% por 1h, a 37°C. O desenvolvimento da atividade enzimática foi obtido pela adição da solução reveladora (20 mg OPD; 10 µL peróxido de hidrogênio; 30 mL de tampão citrato pH 5,0) durante 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida utilizando ácido sulfúrico 4N (Neon, Brasil) e a leitura espectrofotométrica foi executada a 492 nm (VersaMax™ Microplate Reader, Molecular Devices).

4.13 Análise da resposta imune induzida pela vacinação

A resposta imunológica dos camundongos que participaram do ensaio de imunização (subitem 4.4.1.2) foi avaliada de acordo com a produção de anticorpos e o perfil celular induzido pela vacinação.

4.13.1 Produção de anticorpos específicos

4.13.1.1 Reatividade de IgG total

Para avaliar se houve aumento da reatividade de anticorpos específicos após cada imunização foi realizado um ensaio de ELISA. Para tal, uma placa de 96 poços (COSTAR 3590, Corning, EUA) foi sensibilizada com 1×10^{11} TU/poço do pool dos fagos expressando os peptídeos selecionados, isto é, os fagos utilizados como vacina. A placa foi mantida *overnight* a 4°C. Em seguida, os sítios livres foram bloqueados com BSA 5% por 2h, a temperatura ambiente. O soro dos animais dos três grupos imunizados (PBS, fago selvagem e vacina) foi coletado após primeira, segunda e terceira imunizações, assim como trinta dias após a última imunização. Foi realizado um pool destes soros para cada grupo e tempo de imunização e estas amostras foram incubadas após o bloqueio, na diluição 1:100 em BSA (Fitzgerald, EUA) 5%, por 2h, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1:2500 em BSA (Fitzgerald, EUA) 5% por 1h e 30 minutos, à temperatura ambiente. O desenvolvimento da atividade enzimática foi obtido pela adição da solução reveladora (20 mg OPD; 10 µL peróxido de hidrogênio; 30 mL de tampão citrato pH 5,0) durante 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida utilizando ácido sulfúrico 4N (Neon, Brasil) e a leitura espectrofotométrica foi executada a 492 nm (VersaMax™ Microplate Reader, Molecular Devices)

4.13.1.2 Reatividade de subclasses de IgG: IgG1 e IgG2a

Com o objetivo de averiguar se houve diferença na produção de IgG1 e IgG2a entre os grupos imunizados, um ensaio de ELISA foi realizado de acordo com o protocolo descrito no item anterior. Neste caso foram avaliados os pools de soro de cada grupo coletados após 30 dias da última imunização. A diluição dos anticorpos secundários anti IgG1 e IgG2a de camundongo conjugados à peroxidase (Southern Biotech, EUA) foram utilizados na diluição 1:10000 em BSA (Fitzgerald, EUA) 5%.

4.13.2 Perfil celular

4.13.2.1 Preparo das células

A fim de elucidar as possíveis diferenças geradas no perfil imune celular dos camundongos imunizados, o baço destes animais (n=8 por grupo) foi coletado e seus esplenócitos isolados, estimulados e analisados por citometria de fluxo. Para tal, em fluxo laminar, os baços coletados foram macerados em PBS 1x estéril e filtrados com

auxílio de uma membrana de nylon (Cell Strainer 70 µm, BD Biosciences, EUA) em tubo falcon de 50 mL (Olen, China). Os tubos foram centrifugados a 200 g por 6 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o *pellet* foi incubado com 5 mL de solução de lise (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM, EDTA 0,1mM) por 5 minutos, à temperatura ambiente, a fim de lisar as hemácias presentes. Após lavagem com 10 mL de PBS 1x estéril, as células foram centrifugadas novamente a 200 g por 6 minutos, a 4°C e ressuspensas em 3 mL de meio RPMI (Sigma, EUA) suplementado com 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PE 10.000 IU, ES 10.000µg/mL) (Invitrogen, EUA). As células foram contadas em câmara de Neubauer.

4.13.2.2 Citometria de fluxo

Assim, para a análise de citometria, 1×10^6 células foram transferidas para um tubo de citometria e incubadas com brefeldina-A (1:1000) (BD GolgiPlug, BD Biosciences, EUA) por 4h, à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* incubado com corante de viabilidade (1:1000) (FVS700, BD Biosciences, EUA) por 10 minutos, a 4°C. Então, as células foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (0,5% BSA, 0,1% azida sódica em PBS 1x), incubadas com um mix de anticorpos a fim de marcar as moléculas de superfície CD4, CD8, CD19, CD44, CD62L e CD27 (BD Biosciences, EUA), por 15 minutos, a 4°C. Em seguida, após lavagem com PBS 1x estéril, as células foram fixadas com 200 µL de paraformaldeído 4% e incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de PBS 1x aos tubos, que foram então armazenados *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas e incubadas com tampão de permeabilização (0,5% saponina em tampão de lavagem) por 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos que marcam as citocinas IFN-γ e IL-10 (BD Biosciences, EUA) por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão de permeabilização, centrifugadas e ressuspensas em solução de lavagem. A leitura foi feita no citômetro LSRFortessa (BD Biosciences, EUA) e a análise dos resultados foi realizada no software FlowJo. Os anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Marcadores de superfície e citocinas utilizadas para caracterizar o perfil imune induzido após ensaio de imunização.

Marcador	Fluoróforo	Clone	Fabricante
CD4	PerCP-Cy5.5	RM4-5	eBioscience
CD8	PE	53-6.7	BD
CD19	FITC	1D3	BD
CD44	BV510	IM7	BD
CD62L	PE-CF594	MEL-14	BD
CD27	PE-Cy7	LG.3A10	BD
IFN- γ	BV650	XMG1.2	BD
IL-10	BV421	JES5-16E3	BD

4.13.2.3 Cultivo de esplenócitos

Com a finalidade de avaliar o perfil de citocinas produzido pelos grupos imunizados (PBS, Fago Selvagem e Fagos Vacina), os esplenócitos isolados previamente foram plaqueados em duplicata em uma placa de 96 poços (COSTAR 3590, Corning, EUA) e estimulados com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos antígenos brutos de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *T. cruzi*. Além disso, as células também foram estimuladas com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do pool dos fagos vacinais. Como controle positivo, as células foram incubadas com o mitógeno PHA (Fitohemaglutinina, Thermo Fisher Scientific, EUA), na concentração final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como controle negativo, os esplenócitos foram plaqueados apenas em meio RPMI (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PE 10.000 IU, ES 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen, EUA). As placas foram incubadas em estufa (SANYO CO₂ INCUBATOR) à temperatura de 37°C

e 5% de CO₂, por 65h. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para análises posteriores.

4.14 Medida da lesão dos camundongos desafiados por *L. amazonensis*

A lesão foi avaliada semanalmente pela medição da área (altura x largura) da pata dos camundongos desafiados por *L. amazonensis*, com auxílio de um paquímetro (KINGTOOLS).

4.15 Avaliação da carga parasitária

A carga parasitária foi determinada por parasitemia (fase aguda da infecção por *T. cruzi*) e através das técnicas de diluição limitante (amostras de lesão) e/ou PCR em tempo real (amostras de lesão, baço, fígado, coração e intestino).

4.15.1 Parasitemia

4.15.1.1 Parasitemia de camundongos C57BL/6

A parasitemia foi realizada a cada 48h, em 10 animais, a fim de confirmar a primeira infecção. Para tal, os animais foram imobilizados em suporte próprio de modo que somente a cauda ficasse exposta. A ponta da cauda dos animais foi cortada com tesoura e 5 µL de sangue foi coletado e colocado em lâmina sob lamínula que permaneceu em câmara úmida até o momento da leitura. Em seguida, a cauda foi cauterizada a fim de estancar o sangramento e minimizar a possibilidade de infecção para o manuseador. Cinquenta campos da lâmina foram lidos em microscópio óptico (Olympus CX 40), utilizando a objetiva de 40X e o fator de correção de 30. Assim, o número de parasitos/5 µL de sangue foi obtido de acordo com a fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de parasitos por } 5 \mu\text{L de sangue} = \text{N}^{\circ} \text{ de parasitos em } 50 \text{ campos} \times 30$$

4.15.1.2 Parasitemia de camundongos BALB/c

A parasitemia dos animais imunizados e desafiados por *T. cruzi* foi realizada diariamente por 60 dias, de acordo com a metodologia descrita no item anterior.

4.15.2 Diluição limitante

A fim de determinar a carga parasitária dos animais infectados por *L. amazonensis*, parte da lesão cutânea foi coletada e pesada. Em seguida, o material foi macerado em 3 mL de meio RPMI e filtrado com auxílio de uma membrana de nylon (Cell Strainer 70 µm, BD Biosciences, EUA) em tubo falcon de 50 mL (Olen, China). Os tubos foram centrifugados a 150 g por 5 minutos, a 4°C, para eliminação de remanescentes celulares, recuperando-se o sobrenadante. Então, as células foram

centrifugadas novamente a 2000 g por 15 minutos, a 4°C. O *pellet* foi ressuspendido com 1 mL de meio Schneider (Sigma, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PE 10.000 IU, ES 10.000µg/mL) (Invitrogen, EUA).

Para realização da diluição limitante, 220 µL das células foram plaqueados em uma placa de 96 poços (COSTAR 3590, Corning, EUA) e diluídos em escala logarítmica, 10^{-1} a 10^{-11} , em meio Schneider (Sigma, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PE 10.000 IU, ES 10.000µg/mL) (Invitrogen, EUA). As placas foram mantidas a 26°C em estufa BOD por aproximadamente 14 dias. Os poços positivos foram visualizados através de microscópio invertido (Olympus CKX41) e os resultados foram expressos como log negativo do título de parasitos (isto é, a diluição correspondente ao último poço positivo), ajustado por micrograma de tecido.

4.15.3 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

4.15.3.1 Preparo do material e obtenção de DNA

Os tecidos coletados para análise de carga parasitária foram macerados com auxílio de lâminas de bisturi estéreis. O DNA foi extraído de aproximadamente 30 mg de tecido, utilizando o kit *NucleoSpin Tissue - Genomic DNA from tissue* (MACHEREY-NAGEL, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração final foi medida por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, EUA).

4.15.3.2 qPCR

A reação para quantificação da carga parasitária consistiu de 5 µL de Power Syber®-Green ABI (2X) (Thermo Fisher, EUA), 1,0 µL dos primers direto e reverso (2 µM), 3 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA, em um volume final de 10 µL por poço. A quantidade de DNA de cada tecido analisado está descrita na Tabela 2. A quantificação do DNA das espécies de *Leishmania* usadas neste trabalho foram utilizados os primers F (5'-3' CGTGGGGGAGGGGCGTTCT) e R (5'-3' CCGAAGCAGCCGCCCTATT), que amplificam um fragmento de 135 pares de base do gene do kDNA do subgênero *Leishmania*. Para amplificar o DNA de *T. cruzi* foram utilizados os primers F (5'-3' CGAGCTCTTGCCACACGGGGCT) e R (5'-3' CCTCCAAGCAGCGGATAGTTAGG), que amplificam um fragmento de 188 pb do gene de região satélite presente no DNA nuclear do parasito.

Tabela 2. Quantidade de DNA tecidual utilizada para amplificação através de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), em nanograma. A quantificação final foi normalizada, de forma que os resultados foram expressos como número de parasitos por micrograma de DNA tecidual.

Tecido	DNA (ng)
Baço	100
Fígado	100
Coxim plantar	5
Coração	200
Intestino	200

O processo de amplificação ocorreu seguindo os ciclos: pré-desnaturação (95°C por 10 minutos), seguida de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) e anelamento e extensão (60°C por 1 minuto). A análise da qPCR foi realizada pelo 7500 Software v2.0.6 (Thermo Fisher, EUA), e os resultados foram determinados usando o método de curva-padrão. As curvas-padrão foram construídas a partir da diluição seriada do DNA extraído de 10^8 promastigotas de *Leishmania* spp. e 10^8 tripomastigotas de *T. cruzi*. Os resultados foram expressos como número de parasitos por micrograma de DNA tecidual.

4.16 Análises histopatológicas

Os órgãos coletados para as análises de histopatologia foram primeiramente submetidos a um período mínimo de 48 horas de fixação em formol. Após a fixação, um fragmento de cada órgão foi retirado e desidratado em diluições alcólicas crescentes (70% a 100%). Em seguida, os fragmentos foram diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. A partir de cada bloco foram obtidos cortes com 4 μ m de espessura para coloração com hematoxilina e eosina e confeccionadas lâminas para análises histopatológicas e semi-quantitativas.

A descrição histopatológica foi feita do baço, fígado, coração, intestino e lesão (tecido epitelial) de todos os grupos de camundongos. Para as análises semi-quantitativas, realizada para o fígado, coração e intestino dos grupos desafiados, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro acoplado a um sistema de captura digital de Imagem (Motic 2.0). As lesões dos tecidos foram

analisadas avaliando-se o grau de inflamação a partir da captura de 10 imagens aleatórias por lâmina em aumento de 20 vezes.

Fígado

O *score* das lesões hepáticas baseou-se em 4 graus de inflamação do parênquima:

- Grau 0: Ausência de células inflamatórias em torno dos hepatócitos, vasos sanguíneos, ductos biliares e capilares (ausente);
- Grau 1: Regiões do parênquima hepático com pequeno número de células inflamatórias (discreto);
- Grau 2: Parênquima hepático apresentando infiltrado inflamatório difuso e infiltrado inflamatório perivascular em torno dos ductos, com pequenas zonas de necrose dispersas pelo parênquima (moderada);
- Grau 3: Parênquima hepático apresentando infiltrado inflamatório difuso e infiltrado inflamatório perivascular em torno dos ductos além de extensas zonas de necrose dispersas pelo parênquima (acentuada).

Coração

O grau de lesão presente nos cortes histológicos do coração foi classificado em *score*, baseado em 4 graus de inflamação do miocárdio:

- Grau 0: Ausência de células inflamatórias em torno dos cardiomiócitos (ausente);
- Grau 1: Pequeno número de células inflamatórias em torno de alguns cardiomiócitos (discreto);
- Grau 2: Inflamação significativa em torno de alguns cardiomiócitos (moderada);
- Grau 3: Intenso infiltrado inflamatório em torno dos cardiomiócitos (acentuada).

O *score* também baseado em 4 graus de intensidade foi adotado para representar as alterações degenerativas, sendo:

- Grau 0: Ausência de alterações histopatológicas (ausente);
- Grau 1: Degeneração presente em alguns cardiomiócitos (discreto);
- Grau 2: Degeneração presente em alguns cardiomiócitos, enquanto outros encontraram-se em autólise (moderada);

- Grau 3: Aspecto degenerativo e autólise em numerosos cardiomiócitos (acentuada).

Foi realizada varredura completa do corte histológico com aumento de 20X, a fim de identificar e quantificar ninhos de amastigotas nos cortes histológicos do coração.

Intestino

Para a análise semi-quantitativa das lesões intestinais, o score também foi baseado em 4 graus:

- Grau 0: Ausência de infiltrado inflamatório na mucosa, submucosa, muscular e serosa (ausente);
- Grau 1: Regiões da mucosa, submucosa, muscular com um pequeno número de células inflamatórias (discreto);
- Grau 2: Mucosa e submucosa com infiltrado inflamatório difuso e pequenos focos de infiltrado inflamatório na muscular (moderada);
- Grau 3: Mucosa, submucosa, muscular e por vezes a camada serosa com infiltrado inflamatório difuso, além de exuberantes focos inflamatórios na camada muscular (acentuada) e presença de infiltrado em torno dos plexos nervosos (glanglionite).

4.17 Inserção gênica de sequências de interesse em *Leishmania major* deficiente para o gene da centrina (*LmCEN*^{-/-})

A fim de obter parasitos deficientes que também expressassem peptídeos imunogênicos, sequências de interesse foram clonadas em plasmídeos, amplificadas em bactéria e transfetadas na cepa *LmCEN*^{-/-}.

4.17.1 Vetor de expressão pLEXY-ble2.1

O vetor de pLEXY (Jena Bioscience) é reconhecidamente utilizado para expressão de proteínas recombinantes em *Leishmania* spp. Este vetor é projetado para integração no locus do rRNA 18S de *L. tarentolae*. Neste locus, os genes alvo são transcritos pela RNA polimerase I das células hospedeiras, sob o controle de um promotor ribossômico cromossomal. Além disso, o vetor foi projetado com um promotor ribossômico adicional à frente do cassete de expressão, fazendo com que a produção proteica seja otimizada em 50%. O vetor pLEXY-ble2.1 possui o gene de

resistência à ampicilina para seleção positiva das bactérias transformadas, e o gene de resistência à bleomicina para seleção dos parasitos transfectados.

Além disto, o vetor permite a inserção de sequências nucleotídicas em diferentes sítios de clonagem, de maneira que as proteínas podem ser expressas tanto no citosol como secretadas para o exterior do parasito. O mapa do vetor e os sítios de restrição correspondentes a cada modalidade de expressão estão ilustrados na Figura 8. Neste trabalho a mesma sequência peptídica foi flanqueada com diferentes sítios de restrição, a fim de verificar se há diferença na eficiência vacinal destas duas abordagens.

O vetor pLEXY-ble2.1 foi cedido em colaboração com o Dr. Hira Nakhasi, do Laboratory of Bacterial, Parasitic and Unconventional Agents, Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services (DHHS), Estados Unidos.

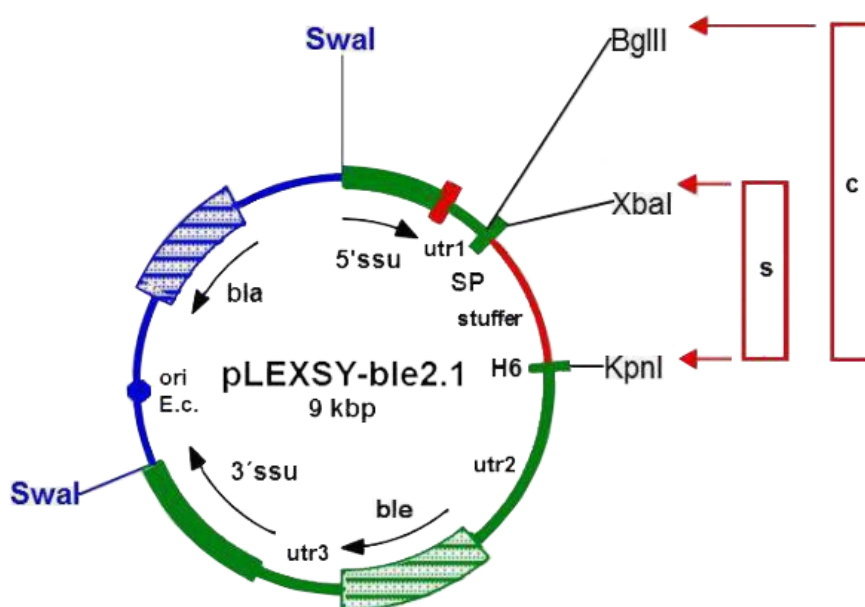


Figura 8. Mapa do vetor pLEXY-ble2.1, ilustrando os sítios de restrição utilizados durante a clonagem. As duas estratégias de clonagem alternativas estão destacadas nas caixas vermelhas, que indicam a expressão citosólica (c: BglIII + KpnI) ou secretória (s: XbaI + KpnI) da proteína alvo. A linearização do vetor é obtida através da ação da enzima Swal. Ble: Gene de resistência à bleomicina; Bla: Gene de resistência à ampicilina.

4.17.2 Construção de vetor pUC57 com sequências peptídicas selecionadas por *phage display*

As sequências nucleotídicas referentes aos peptídeos selecionados por *phage display* foram otimizadas através da tabela de viés de uso de códon em *Leishmania major* (HORN, 2008). Estas sequências foram espaçadas entre si pela sequência nucleotídica referente aos aminoácidos ALA-SER-PRO-ARG-LYS. À estas sequências foram adicionadas alternativamente duas duplas diferentes de sítios de restrição (BglII + KpnI para expressão citosólica e XbaI + KpnI para expressão secretória), assim como o códon iniciador ATG e uma cauda de hemaglutinina (HA). Na sequência de expressão citosólica, por conter o sítio de restrição BglII, o códon ATG foi precedido do códon GCC, a fim de potencializar os níveis de expressão (LUKEŠ *et al.*, 2006). As sequências finais foram clonadas comercialmente no vetor pUC57 (GenScript, EUA).

4.17.2 Preparo de bactérias *E.coli* competentes

Com o objetivo de tornar as células aptas a receber DNA exógeno, bactérias *E. coli* DH5 α foram cultivadas em meio LB, 200 rpm, a 37°C (OD 600 nm = 0,4 a 0,6). Em seguida, foram mantidas em gelo por 20 minutos e centrifugadas a 1100 g, por 20 minutos, 4°C. O *pellet* foi ressuspendido com CaCl₂ 0,1 M e mantido em gelo por 30 minutos. Após este período, as bactérias foram centrifugadas novamente a 1100 g, por 15 minutos, 4°C, ressuspendidas em CaCl₂ 0,1 M e aliquoteadas com 15% de glicerol estéril. As alíquotas foram mantidas a -80°C para serem utilizadas em transformações.

4.17.3 Transformação de bactérias *E. coli*

Para transformar as bactérias competentes com o vetor de expressão pLEXY-ble2.1 (Jena Bioscience), as células foram incubadas em gelo por 20 minutos. Em seguida, 1 μ g de DNA plasmidial foi adicionado à bactéria e incubado em gelo por 45 minutos. Posteriormente, as células foram submetidas ao choque térmico (42°C por 15 minutos) e mantidas em gelo por 3 minutos. Após este período, as bactérias foram incubadas a 30°C, 150 rpm, por 1h, e centrifugadas a 3200 g, por 5 minutos, a temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspenso em 100 μ L de meio LB, plaqueado em meio LB ágar acrescido de ampicilina (100 μ g/mL) e mantido a 30°C overnight. Colônias isoladas foram cultivadas em meio LB acrescido de ampicilina (100 μ g/mL), 200 rpm, a 30°C, *overnight*.

A obtenção do DNA plasmidial foi realizada através do kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração final foi medida por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, EUA).

4.17.4 Digestão dos vetores de clonagem (pUC57) e de expressão (pLEXY-ble2.1)

Os vetores de clonagem (pUC57) e de expressão (pLEXY-ble2.1) foram digeridos com os pares de enzimas de restrição BglII + KpnI e XbaI + KpnI (New England Biolabs), de acordo com os protocolos sugeridos pelo fabricante.

4.17.5 Purificação de banda em gel de agarose

A fim de separar os fragmentos digeridos, o DNA dos vetores pUC57 e pLEXY-ble2.1 foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (0,7%). As bandas com tamanho esperado foram excisadas com lâmina de bisturi estéril e o DNA de interesse foi extraído utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Alemanha).

4.17.6 Ligação da sequência de interesse ao vetor pLEXY

A ligação entre os fragmentos obtidos dos vetores pUC57 e pLEXY foi realizada através de suas extremidades coesivas, com auxílio da enzima T4 ligase (New England Biolabs), de acordo com as recomendações do fabricante. Após incubação por 16h, a 4°C, os produtos de ligação foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5 α , de acordo com o protocolo descrito no subitem 4.17.3.

4.17.7 Sequenciamento do vetor pLEXY com insertos de interesse

Os produtos de ligação (pLEXY + sequências de interesse) foram sequenciados pela plataforma *Genomics Shared Resource* integrada ao *Ohio State University Comprehensive Cancer Center* (OSUCCC), utilizando os primers F (5'-3' CCGACTGCAACAAGGTGTAG) e R (5'-3' CATCTATAGAGAAGTACACGTAAAAG).

4.17.8 Amplificação do vetor pLEXY com insertos de interesse

Após confirmação da ligação correta por sequenciamento, os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram amplificados em *E. coli* DH DH5 α , de acordo com o protocolo descrito no subitem 4.17.3. O DNA foi extraído utilizando o kit Plasmid Plus Maxi (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A

concentração final foi medida por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, EUA).

4.17.9 Linearização do vetor pLEXSY e esterilização do DNA

O DNA plasmidial obtido foi linearizado com a enzima de restrição SwaI (New England Biolabs), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Em seguida, as amostras foram esterilizadas por precipitação de etanol. Brevemente, ao DNA linearizado (em volume final de 200 µL) foram adicionados 20 µL de solução de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 500 µL de etanol 100%. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 30 minutos, a -80°C. Após este período, os tubos foram centrifugados a 15500 g por 30 minutos, a 4°C. Em fluxo laminar, o *pellet* foi lavado com etanol 70% estéril e os tubos foram novamente centrifugados a 15500 g por 10 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o etanol remanescente foi deixado para evaporar por 10 minutos. O DNA, estéril, foi ressuspendido em água ultrapura.

4.17.10 Transfecção

A transfecção da sequência construída em promastigotas de *Leishmania major* deficientes para o gene da centrina (*LmCEN*^{-/-}) foi realizada utilizando o kit Human T Cell Nucleofector (Lonza Biosciences). Para cada transfecção foram utilizadas 5x10⁷ promastigotas de *LmCEN*^{-/-}. Brevemente, os parasitos foram centrifugados a 1100 g, por 5 minutos e lavados com PBS 1x estéril. O *pellet* foi ressuspendido em 82 µL da solução “Human T Cell Nucleofector” e 18 µL da solução “Supplement 1”. Em seguida, o volume foi homogeneizado e transferido para cubeta de transfecção, onde foi adicionado 20 µg de DNA da sequência de interesse. Como controle ou “mock”, 5 x10⁷ promastigotas foram preparadas da mesma maneira descrita anteriormente, com exceção da adição de DNA. A transfecção foi realizada utilizando o programa V-033 do aparelho Amaxa Nucleofector 2b (Lonza Biosciences).

4.17.11 Seleção de *LmCEN*^{-/-} recombinante

Após transfecção, os parasitos foram cultivados em meio 199, preparado de acordo com o subitem 4.1.2. No dia seguinte, o antibiótico bleomicina (4 µg/mL) foi adicionado às culturas, a fim de selecionar os parasitos transfectados. As culturas foram mantidas em passagens semanais e a seleção policlonal foi concluída no momento em que o crescimento dos parasitos não transfectados (mock) cessou.

A seleção clonal foi realizada através do plaqueamento das promastigotas transfectadas em meio 199 sólido acrescido de bleomicina (4 µg/mL). Colônias individuais foram selecionadas e cultivadas novamente em meio líquido. Após expansão, os parasitos foram congelados e mantidos a -80°C.

4.18 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0. A normalidade dos dados foi determinada pelo teste Kolmogorov-Smirnoff. Os dados de natureza paramétrica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou Holm-Sidak, enquanto que para os dados não-paramétricos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunns. Os dados obtidos foram considerados significativos quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO 1: Seleção de candidatos vacinais através da técnica de *phage display*

5.1.1 Infecções por *LdCEN*^{-/-} e *T. cruzi* Y estimularam produção crescente e significativa de IgG específica

Imunoglobulinas são comumente utilizadas na seleção de peptídeos através da técnica de *phage display*. A obtenção de IgG de alta afinidade foi possível através de infecções sucessivas com as cepas *LdCEN*^{-/-} e *T. cruzi* Y, como demonstrado pela Figura 9. A produção de IgG foi significativa logo após a primeira infecção com *LdCEN*^{-/-}, com crescimento gradual que se manteve significativo ao longo das três infecções. Por outro lado, apenas a reinfeção com *T. cruzi* induziu produção satisfatória de anticorpos.

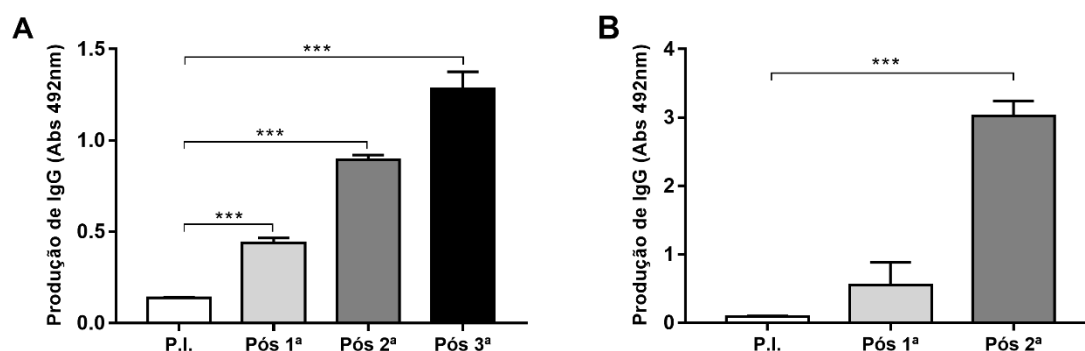


Figura 9. Produção de IgG após infecções sucessivas com *LdCEN*^{-/-} e *T. cruzi* Y. Foi avaliada a reatividade entre IgG presente no soro dos camundongos (pool) e antígeno bruto dos respectivos parasitos. P.I. = Pré Imune; Pós 1ª, Pós 2ª e Pós 3ª infecções. (A) Produção de anticorpos após uma, duas e três infecções com a cepa *LdCEN*^{-/-} em camundongos BALB/c. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. (B) Produção de anticorpos após primeira e segunda infecção com a cepa *T. cruzi* Y em camundongos C57BL/6. Os dados foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

A produção de anticorpos referente à primeira infecção com *T. cruzi* é reflexo do inóculo utilizado (1000 tripomastigotas), que por sua vez resultou em baixa parasitemia (Figura 10). O pico de parasitemia ocorreu no 14º dia após infecção, com uma média de 2688 formas tripomastigotas/5 μ L. Assim, considerando o interesse em obter uma grande quantidade de anticorpos da classe IgG com alta afinidade, os

animais foram reinfectedados no 30º dia após primeira infecção, com inóculo de 10000 tripomastigotas.

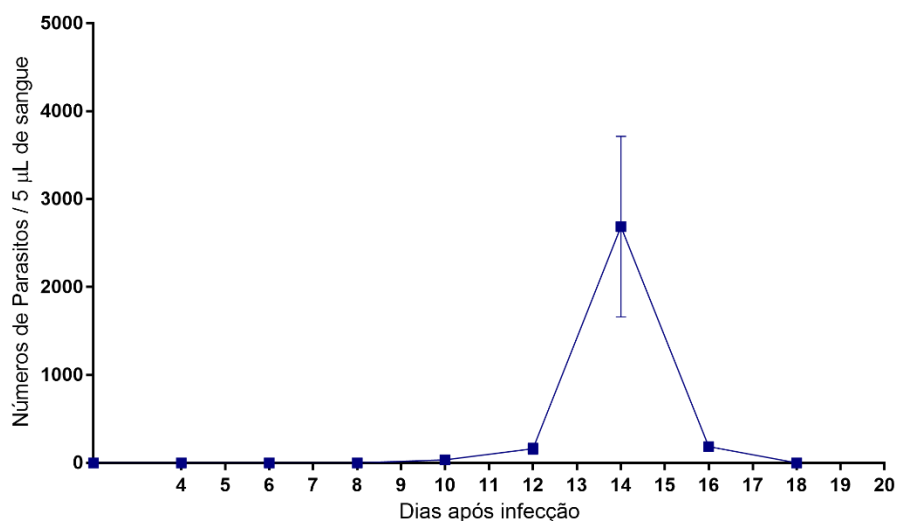


Figura 10. Curva de parasitemia em camundongos C57BL/6 infectados com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* Y. O padrão de parasitemia demonstra que o pico de infecção ocorreu no 14º dia pós infecção, que se tornou crônica a partir do 18º dia pós infecção. Os resultados são apresentados como a média \pm SD.

Uma triagem do soro dos camundongos infectados três vezes com *LdCEN*^{-/-} e duas vezes com *T. cruzi* Y foi realizada a fim de excluir do pool final amostras pouco reativas (Figura 11). O ponto de corte foi considerado cinco vezes o valor de reatividade dos animais pré-imunes. Por este critério, o soro dos animais 7 e 34 infectados com *LdCEN*^{-/-} foram excluídos do pool final destinado à purificação de IgG (Figura 11A). Todos os soros de animais reinfectedados com *T. cruzi* participaram do pool para purificação de IgG (Figura 11B).

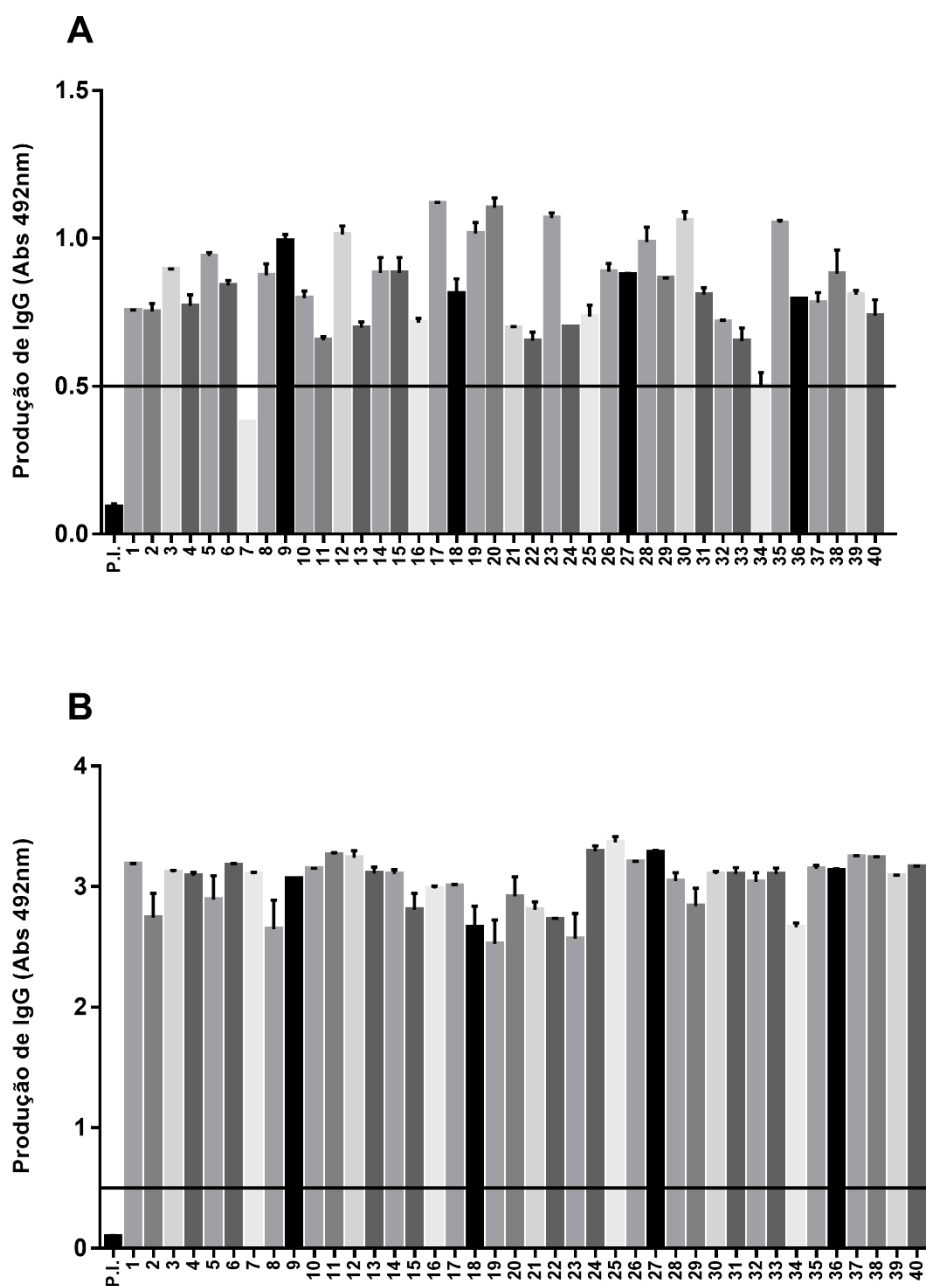


Figura 11. Produção de IgG após infecções com *LdCEN*^{-/-} e *T. cruzi* Y. Foi avaliada a reatividade entre IgG presente no soro de camundongos infectados e antígeno bruto dos respectivos parasitos. P.I.= Pré-imune; 1 a 40 = Identificação numérica dos camundongos infectados. (A) Reatividade do soro de 40 camundongos de linhagem BALB/c infectados três vezes com a cepa *LdCEN*^{-/-}. (B) Reatividade do soro de 40 camundongos de linhagem C57BL/6 infectados duas vezes com a cepa *T. cruzi* Y. Amostras com reatividade < 0,5 foram excluídas dos experimentos posteriores. Os resultados são apresentados como a média ± SD.

A reatividade de IgGs basal e específica para *LdCEN*^{-/-} e para *T. cruzi* Y foi avaliada em relação ao antígeno de cada parasito, após purificação em coluna de Proteína A-Sepharose 4B. Os resultados obtidos demonstraram que as IgGs anti-*LdCEN*^{-/-} (Figura 12A) e anti-*T. cruzi* Y (Figura 12B) apresentaram reatividade proporcional às concentrações de utilizadas, enquanto as IgGs basais não exibiram reatividade significativa frente aos antígenos correspondentes. Assim, com base nesta análise, utilizamos as concentrações de 50, 30 e 10 µg/mL em cada ciclo de seleção da técnica de *phage display*, a fim de aumentar a especificidade da ligação IgG-epitopo.

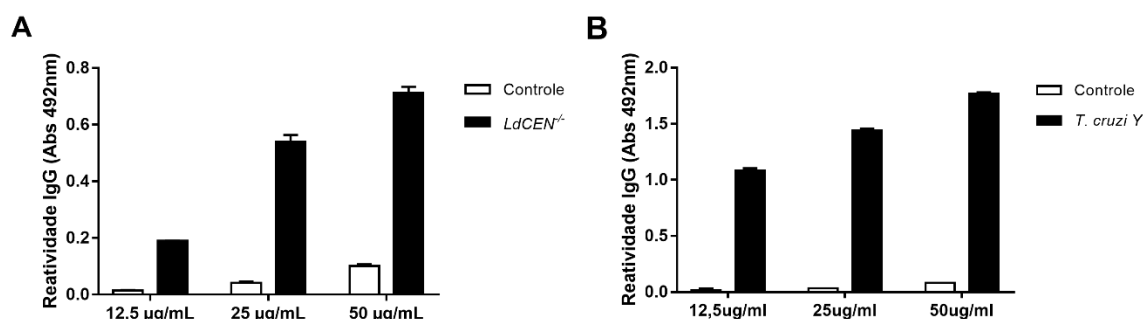


Figura 12. Reatividade de IgG basal e específica para (A) *LdCEN*^{-/-} e (B) *T. cruzi* Y. Foram utilizadas concentrações crescentes (12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL) de IgG basal e específica. Em ambos os casos foi possível observar que a reatividade foi proporcional ao aumento de concentração das imunoglobulinas específicas. Os resultados são apresentados como a média ± SD.

5.1.2 Identificação de peptídeos selecionados por *phage display*

A reatividade dos peptídeos expressos na superfície dos fagos foi avaliada após os três ciclos de seleção (Figura 13). É esperado haja aumento gradual de afinidade entre peptídeos selecionados e o anticorpo, a cada ciclo. No entanto, em relação à seleção realizada utilizando IgG anti-*LdCen*^{-/-}, o segundo ciclo apresentou a maior reatividade entre os três, de forma que clones pertencentes ao segundo ciclo foram selecionados para triagem (Figura 13A). Quanto à seleção por IgG anti-*T. cruzi*, houve aumento de afinidade no segundo e terceiro ciclo (Figura 13B). Neste caso, apenas os clones pertencentes ao terceiro ciclo foram triados.

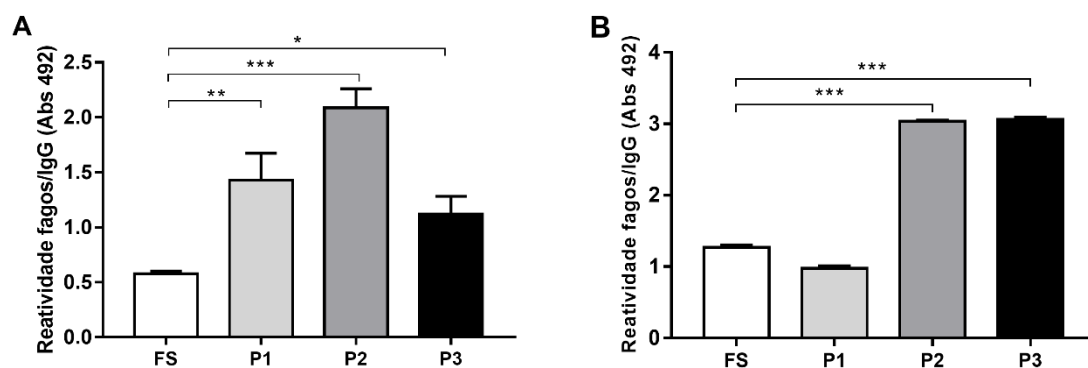
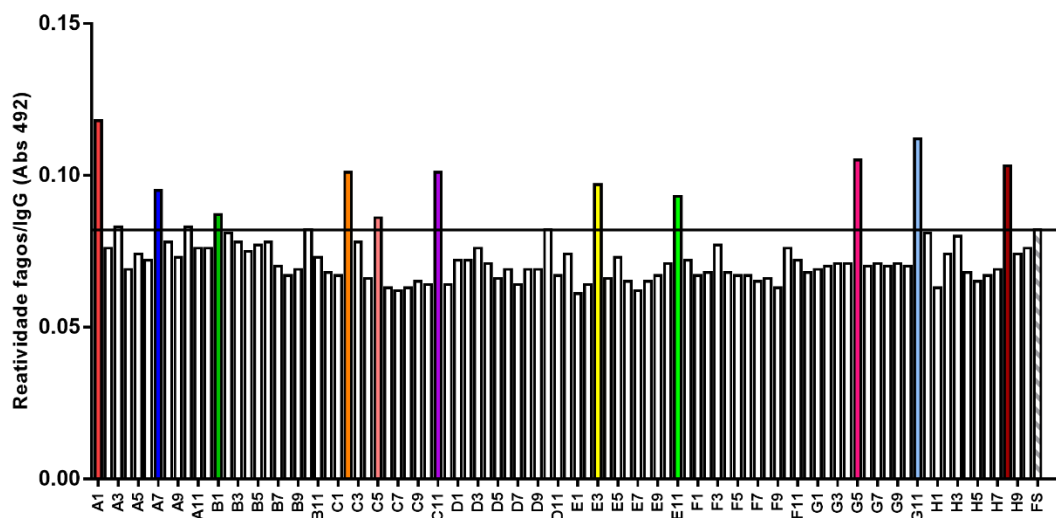


Figura 13. Reatividade dos fagos selecionados após ciclos 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3), em comparação ao fago selvagem (FS). (A) Seleção utilizando IgG anti-*LdCEN*^{-/-}. É possível observar aumento gradual de reatividade até o segundo ciclo de seleção. No terceiro ciclo há queda de reatividade, mas ainda há diferença significativa em relação ao controle (FS). (B) Seleção utilizando IgG anti-*T. cruzi*. Apesar da absorbância referente ao fago selvagem ser considerada alta, houve aumento significativo de reatividade no segundo e terceiro ciclo de seleção. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Considerando a maior reatividade expressa pelos fagos obtidos após segundo ciclo de seleção com a IgG anti-*LdCEN*^{-/-}, uma triagem foi realizada utilizando 95 clones provenientes deste ciclo (Figura 14A). Da mesma forma, 95 clones expressando peptídeos provenientes do terceiro ciclo de seleção com a IgG anti-*T. cruzi* foram triados (Figura 14B). A reatividade do clone de fago selvagem foi utilizada como valor de corte em ambos os casos. Assim, 11 clones selecionados pela IgG anti-*LdCEN*^{-/-} e 24 clones selecionados pela IgG anti-*T. cruzi* foram enviados para sequenciamento.

A



B

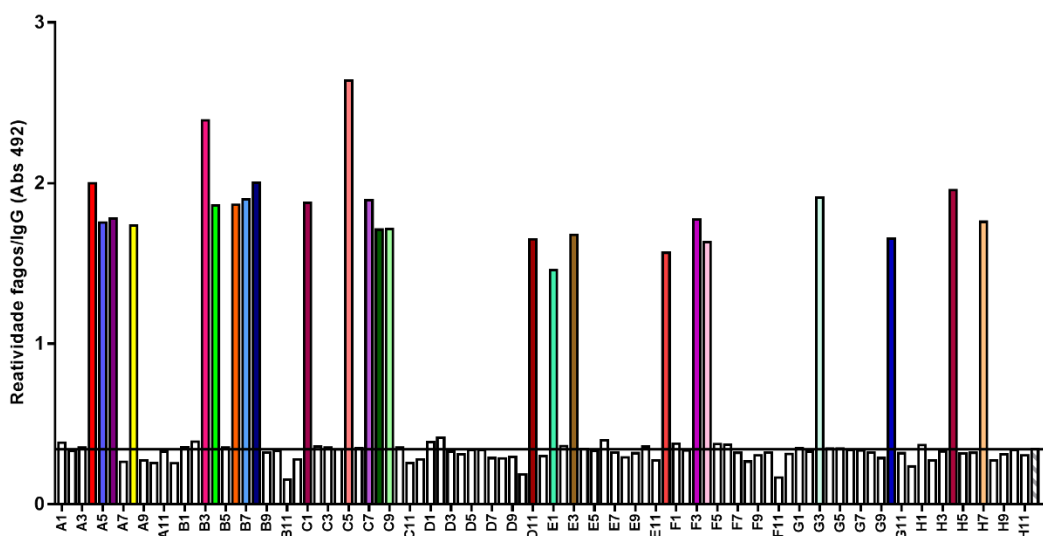


Figura 14. Reactividade individual de 95 clones selecionados por (A) IgG anti-*LdCEN*^{-/-} e (B) IgG anti-*T. cruzi*. A linha indica o valor de corte, relativo à reatividade do fago selvagem (barra hachurada). A1 a H11 = Identificação dos clones triados; FS = Fago Selvagem. As barras coloridas representam os fagos selecionados para sequenciamento, (A) 11 pela IgG anti-*LdCEN*^{-/-} e (B) 24 pela IgG anti-*T. cruzi*.

Após sequenciamento foram obtidos 7 peptídeos específicos para *LdCEN*^{-/-} e 3 para *T. cruzi*. Os peptídeos obtidos, o número de aminoácidos correspondente e suas seqüências estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Peptídeos selecionados pela técnica Phage Display, através do reconhecimento específico de IgG anti-*LdCen*^{-/-} e anti-*T. cruzi* Y.

Identificação do peptídeo	Número de aminoácidos	IgG utilizada para seleção
1	15 aa	Anti- <i>LdCen</i> ^{-/-}
2	12 aa	Anti- <i>LdCen</i> ^{-/-}
3	15 aa	Anti- <i>LdCen</i> ^{-/-}
4	12 aa	Anti- <i>LdCen</i> ^{-/-}
5	15 aa	Anti- <i>LdCen</i> ^{-/-}
6	15 aa	Anti- <i>LdCen</i> ^{-/-}
7	12 aa	Anti- <i>LdCen</i> ^{-/-}
8	12 aa	Anti- <i>T. cruzi</i> Y
9	12 aa	Anti- <i>T. cruzi</i> Y
10	17 aa	Anti- <i>T. cruzi</i> Y

Porções dos peptídeos 1, 5, 6 e 7 exibiram correspondência com diferentes proteínas descritas no proteoma de *Leishmania* spp. Os percentuais de identidade e cobertura de cada *match* estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Correspondência entre peptídeos selecionados e proteínas descritas no proteoma de *Leishmania* spp.

Identificação do peptídeo	Proteína de <i>Leishmania</i> spp.	Identidade	Cobertura
1	A	76,5%	100%
5	B	60%	60%
6	C	87,5%	53%
7	D	85,7%	58%

5.1.3 Avaliação sorológica de peptídeos selecionados por Phage Display

Os peptídeos específicos selecionados para *LdCEN*^{-/-} foram sintetizados em membrana de celulose e foram avaliados como antígeno na detecção da IgG anti-*LdCen*^{-/-}. Além disso, a fim de avaliar a ocorrência de reatividade cruzada, a membrana foi incubada com IgG anti-*T. cruzi*, presente no soro de camundongos infectados. É possível observar, na Figura 15, que os peptídeos não reagiram em contato com o soro de camundongos saudáveis. Por outro lado, os peptídeos 1, 2, 3, 4 e 7 apresentaram sororreatividade para IgG anti-*LdCEN*^{-/-} e 4, 6 e 7 foram reconhecidos pela IgG anti-*T. cruzi*.

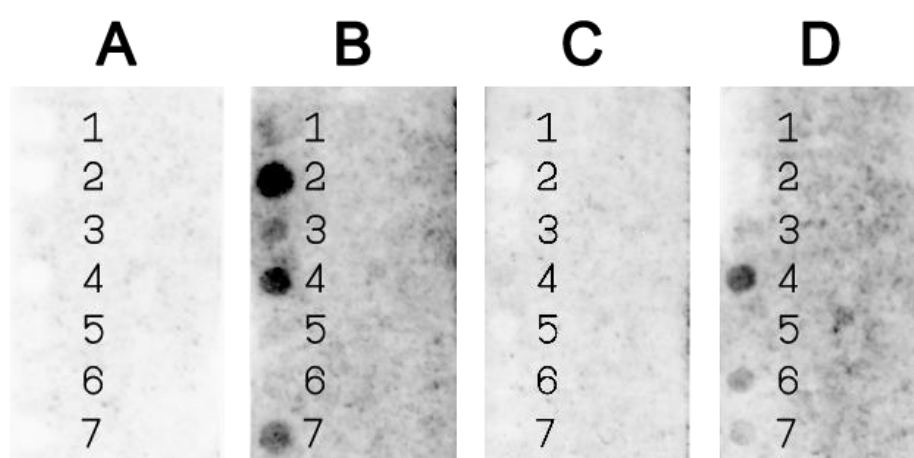


Figura 15. Análise da reatividade dos peptídeos específicos para *LdCen*^{-/-}, sintetizados em membrana de celulose. (A) Reatividade frente à IgG basal de camundongos BALB/c saudáveis. (B) Reatividade frente à IgG anti-*LdCen*^{-/-}. (C) Reatividade frente à IgG basal de camundongos C57BL/6 saudáveis. (D) Reatividade frente à IgG anti-*T. cruzi*.

Todos os peptídeos foram sintetizados de maneira solúvel, a fim de permitir que assumissem uma estrutura termodinamicamente estável e exibissem possíveis epitopos conformacionais. Após síntese, a massa molecular de cada peptídeo foi confirmada através da técnica MALDI-TOF-TOF (Anexo II). Foi avaliado o reconhecimento destes peptídeos pelos anticorpos gerados pelas infecções por *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ou *T. cruzi*, de maneira que todos foram reconhecidos por soros de animais com pelo menos uma infecção (Figura 16). Alternativamente, um pool contendo todos os peptídeos foi reconhecido diferencialmente tanto por anticorpos anti-*LdCEN*^{-/-} como anti-*T. cruzi* (Figura 17).

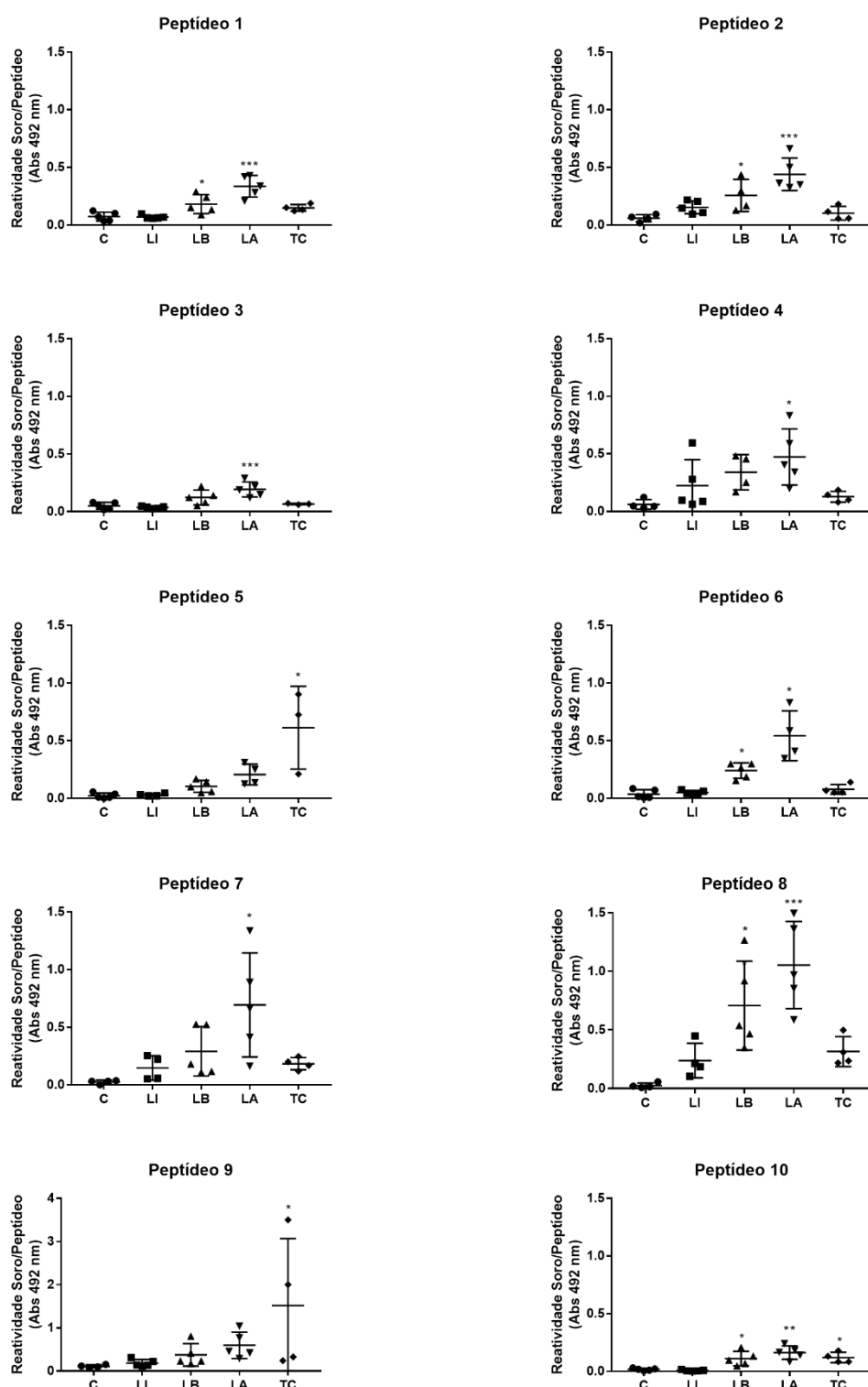


Figura 16. Reatividade dos peptídeos solúveis 1 a 10 frente aos anticorpos gerados por camundongos (n=5) infectados por *L. infantum* (LI), *L. braziliensis* (LB), *L. amazonensis* (LA) ou *T. cruzi* (TC). Como controle foram utilizados camundongos C57BL/6 saudáveis (C) (n=5). Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett ou pelo teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

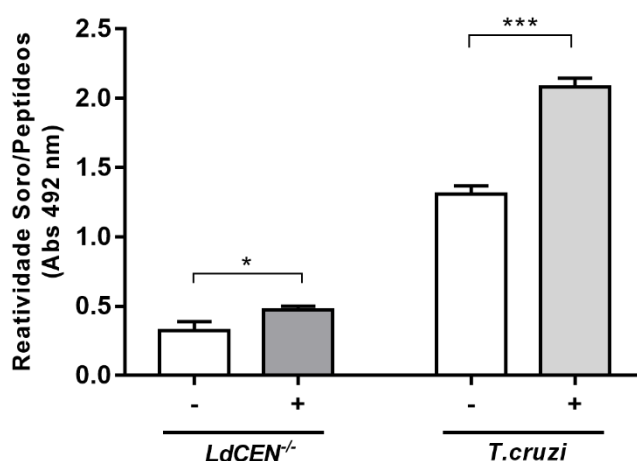


Figura 17. Reatividade do pool de peptídeos solúveis 1 a 10 frente ao pool de soros gerados pelas infecções por *LdCEN*^{-/-} (n=38) e *T. cruzi* (n=40). Como controle (-) foram utilizados camundongos BALB/c (*LdCEN*^{-/-}) e C57BL/6 (*T. cruzi*) saudáveis. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * p < 0,05; ** p < 0,001 e ***p < 0,0001.

Coletivamente, estes resultados demonstram que os peptídeos selecionados são reconhecidos por anticorpos produzidos contra *Leishmania* spp. e *T. cruzi* e têm potencial para integrar uma vacina contra estes parasitos.

5.2 CAPÍTULO 2: Avaliação de parâmetros imunológicos, parasitológicos e histopatológicos associados à imunização com vacina pan-tripanosomatídeos

5.2.1 Imunização com vacina induziu produção crescente e significativa de anticorpos

Os camundongos que participaram do ensaio de imunização receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou um pool contendo os clones de fagos selecionados por *phage display*, denominados como vacina (V). Enquanto a imunização com o fago selvagem induziu uma produção potente de IgG que se manteve estável ao longo das imunizações, os animais que receberam a vacina produziram IgG de maneira crescente e significativa ao longo do mesmo período. Ambos os grupos mantiveram os níveis de anticorpos 30 dias após a última imunização (Figura 18).

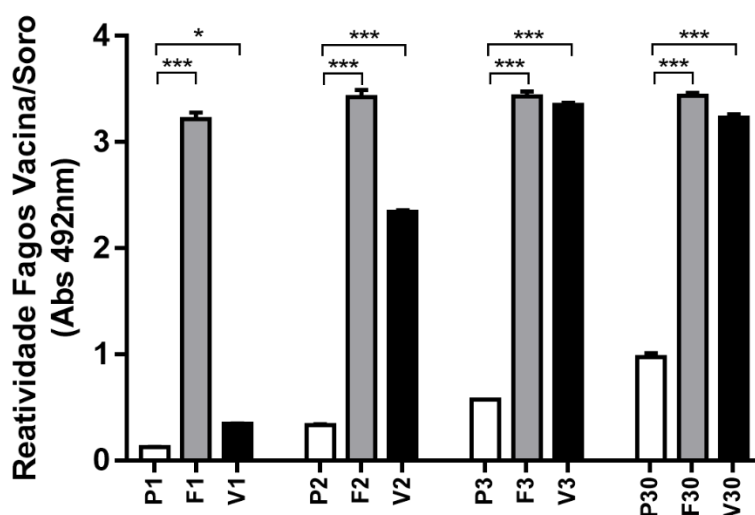


Figura 18. Reatividade de IgG total após 1ª (P1, F1, V1), 2ª (P2, F2, V2), 3ª imunização (P3, F3, V3) e 30 dias após 3ª imunização (P30, F30, V30). Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). A produção de anticorpos foi quantificada através da reatividade entre o pool de soro dos animais de cada grupo/tempo e os fagos utilizados para vacinação. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Embora os grupos que receberam fago selvagem e vacina tenham produzido níveis superiores e significativos das subclasses IgG1 (Figura 19A) e IgG2a (Figura 19B) quando comparados ao grupo controle, não houve diferença significativa entre eles.

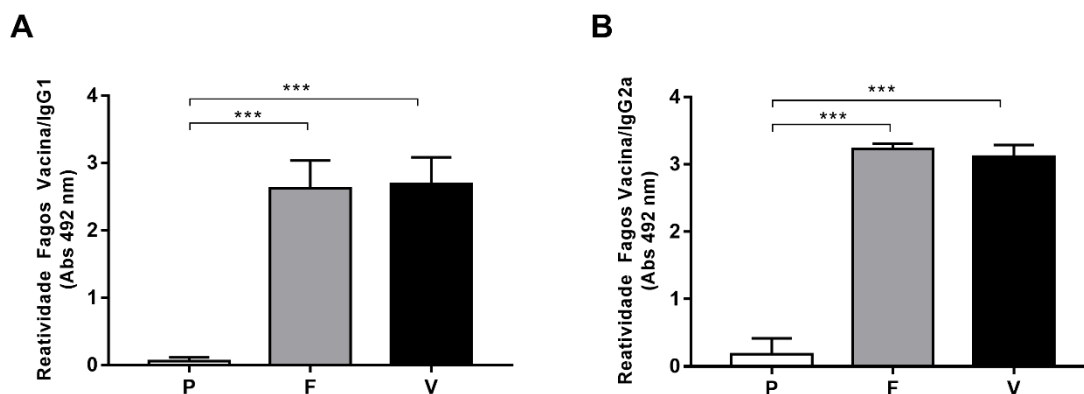


Figura 19. Reatiidade das subclasses IgG1 (A) e IgG2a (B), avaliada 30 dias após a 3ª imunização. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). A produção de anticorpos foi quantificada através da reatividade entre o pool de soro dos animais de cada grupo e os fagos utilizados para vacinação. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.2.2 Imunização com vacina induziu perfil celular de memória, aumento de IFN- γ e redução de IL-10

A imunização com a vacina induziu maior proliferação de células T de memória (CD44⁺) em relação ao grupo controle (Figura 20A). Houve também maior produção de IFN- γ por células T auxiliares (T CD4⁺) do grupo vacinado, o que ocorreu em maior intensidade com o grupo que recebeu fago selvagem (Figura 20B). Além disso, a imunização com a vacina resultou em aumento de células de memória efetora (CD27⁺CD4⁺) (Figura 20C), que por sua vez apresentaram níveis reduzidos da produção de IL-10 (Figura 20D), quando comparadas com o grupo controle.

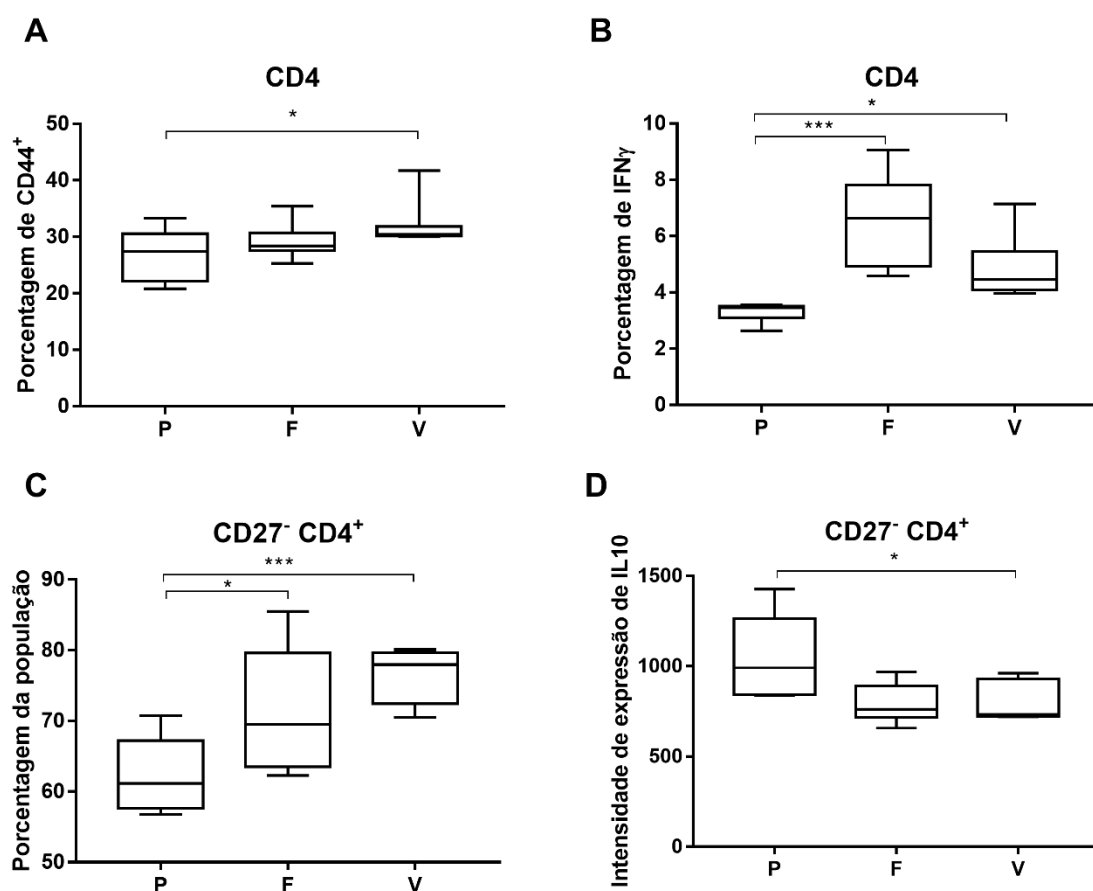


Figura 20. Perfil celular de linfócitos T auxiliares (CD4) gerado após ensaio de imunização. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). (A) Aumento de células T de memória no grupo vacinado (V) em relação ao grupo controle (P). (B) Aumento da produção de IFN- γ por células T CD4 nos grupos que receberam fago selvagem (F) e vacina (V). (C) Aumento da população de células T de memória efetora nos grupos que receberam fago selvagem (F) e vacina (V). (D) Redução da produção de IL-10 no grupo vacinado (V), em relação ao controle (P). Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey ou utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como mediana, valores máximos e mínimos. Os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

O aumento na produção de IFN- γ foi mantido pelas células T citotóxicas (T CD8⁺) dos grupos que receberam fago selvagem ou vacina (Figura 21A). Nas células de memória (CD44⁺), essa produção foi significativa apenas no grupo vacinado (Figura 21B). De maneira análoga ao que ocorreu com as células T auxiliares, houve aumento na proliferação de células T citotóxicas de memória efetora (CD27⁻ CD8⁺) tanto no grupo que recebeu fago selvagem como no vacinado (Figura 21C), assim como redução da produção de IL-10 por estes grupos, em relação ao controle (Figura 21D).

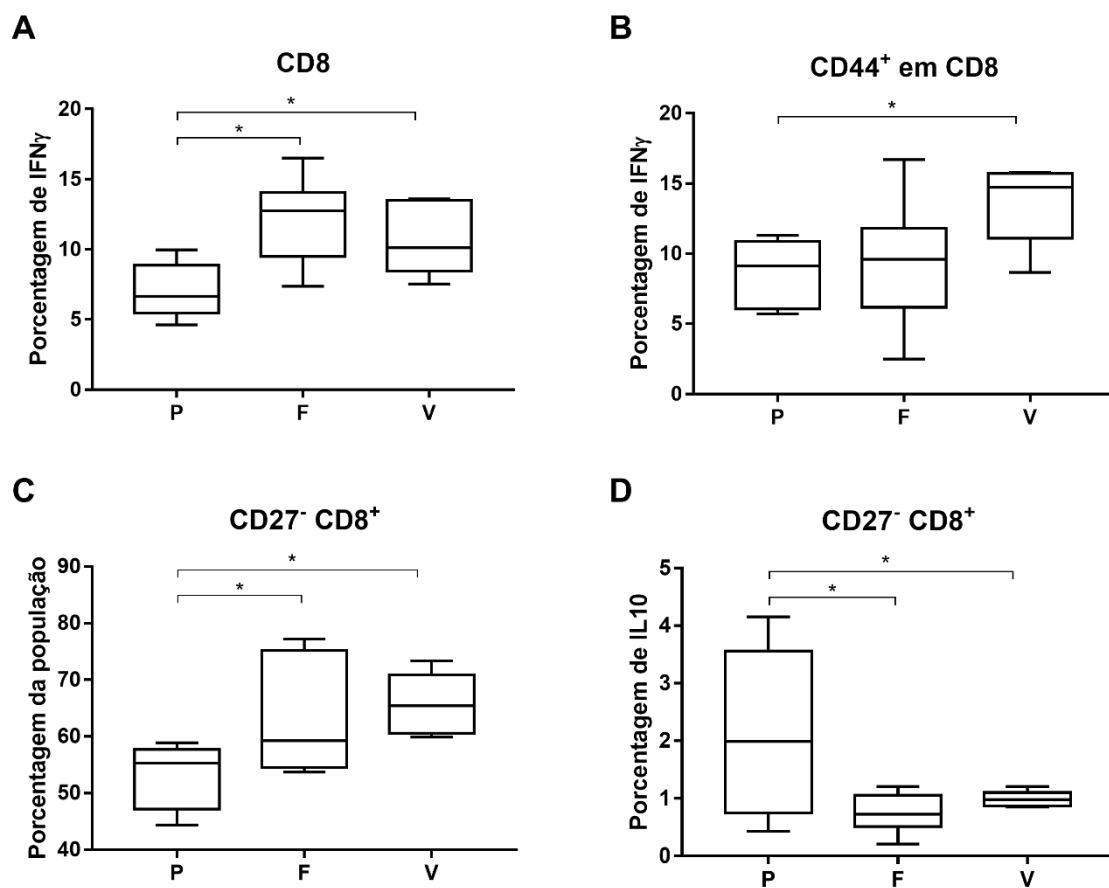


Figura 21. Perfil celular de linfócitos T citotóxicos (CD8) gerado após ensaio de imunização. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). (A) Aumento da produção de IFN- γ por células T CD8 nos grupos que receberam fago selvagem (F) e vacina (V). (B) Aumento da produção de IFN- γ por células de memória (CD44⁺) do grupo vacinado. (C) Aumento da população de células T de memória efetora nos grupos que receberam fago selvagem (F) e vacina (V). (D) Redução da produção de IL-10 nos grupos que receberam fago selvagem (F) e vacina (V), em relação ao controle (P). Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak ou utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como mediana, valores máximos e mínimos. Os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.2.3 Imunização com vacina reduziu a carga parasitária das infecções por *Leishmania* spp. e *T. cruzi*

Em relação aos animais desafiados por *L. infantum*, a imunização foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária no baço dos animais que receberam fago selvagem (~92%) e vacina (~97%) (Figura 22A). Por outro lado, não houve diferença no número de parasitos encontrados no fígado destes animais (Figura 22B).

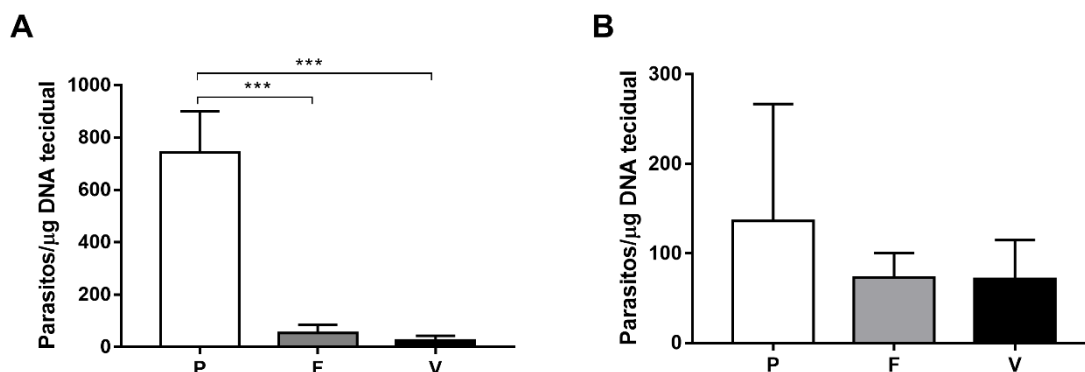


Figura 22. Carga parasitária do (A) baço e (B) fígado de animais imunizados e desafiados por *L. infantum*, obtida por PCR quantitativa. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). Os resultados são expressos como número de parasitos detectados por micrograma de DNA tecidual analisado. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey ou utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

A determinação de carga parasitária dos animais desafiados por *L. amazonensis* foi realizada através de duas metodologias distintas. Enquanto a análise por diluição limitante revelou redução de carga parasitária na lesão dos animais que receberam fago selvagem (~99%) e vacina (~99%) (Figura 23A), a avaliação por PCR quantitativa indicou que não houve diferença entre os grupos (Figura 23B). Além disso, não houve diferença no tamanho das lesões cutâneas provocadas pela infecção em nenhum dos grupos (Figura 24).

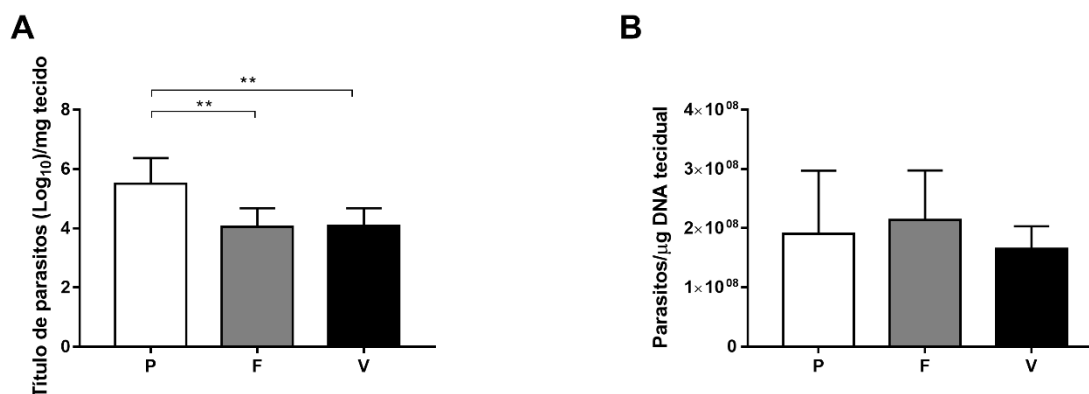


Figura 23. Carga parasitária da lesão cutânea (coxim plantar) de animais desafiados por *L. amazonensis*, obtida por (A) diluição limitante e (B) PCR quantitativa. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). Os resultados são expressos como (A) log do título de parasitos por miligrama de tecido e (B) número de parasitos detectados por micrograma de DNA tecidual analisado. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

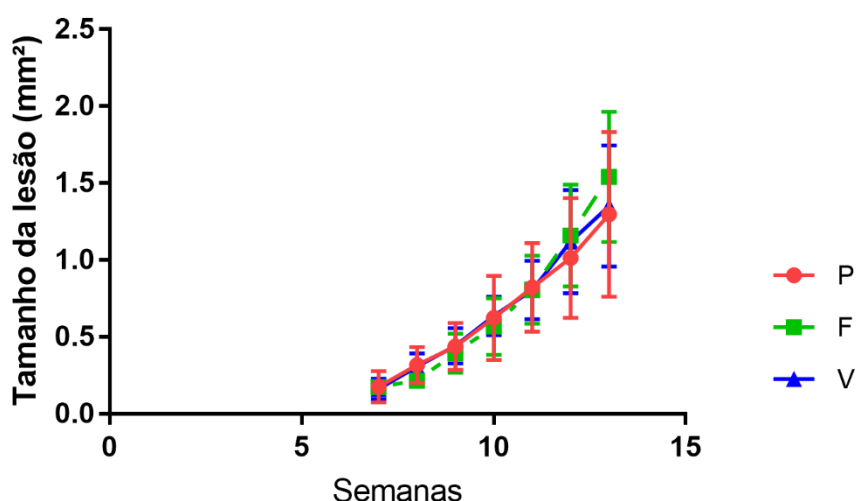


Figura 24. Evolução do tamanho das lesões cutâneas de animais imunizados e desafiados por *L. amazonensis* no coxim plantar. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). A área foi calculada a partir da multiplicação das medidas de altura e largura da lesão, realizadas semanalmente com auxílio de paquímetro. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados são apresentados como a média \pm SD.

A imunização com a vacina também foi capaz de reduzir a carga parasitária da infecção causada por *T. cruzi*, tanto na fase aguda como na crônica. Ao comparar o grupo vacinado ao controle foi possível observar redução de aproximadamente 80% da carga parasitária no 8º dia pós infecção, antecedendo o pico de parasitemia (Figura 25). Além disso, houve uma diferença significativa entre a parasitemia dos grupos vacinado e controle a partir do 19º dia pós infecção, com uma média de

aproximadamente 70% de redução no número de parasitos circulantes. Não houve diferença entre a parasitemia do grupo controle e grupo imunizado com fago selvagem em nenhum momento da análise. Aliado a isto, a partir do 29º dia pós infecção não foi possível detectar parasitos no sangue dos animais vacinados. Por outro lado, a parasitemia permaneceu constante nos grupos controle e imunizado com fago selvagem até o 45º dia pós infecção. Ademais, foi possível observar acentuada perda de peso no grupo controle, a partir do 52º dia pós infecção (Figura 26).

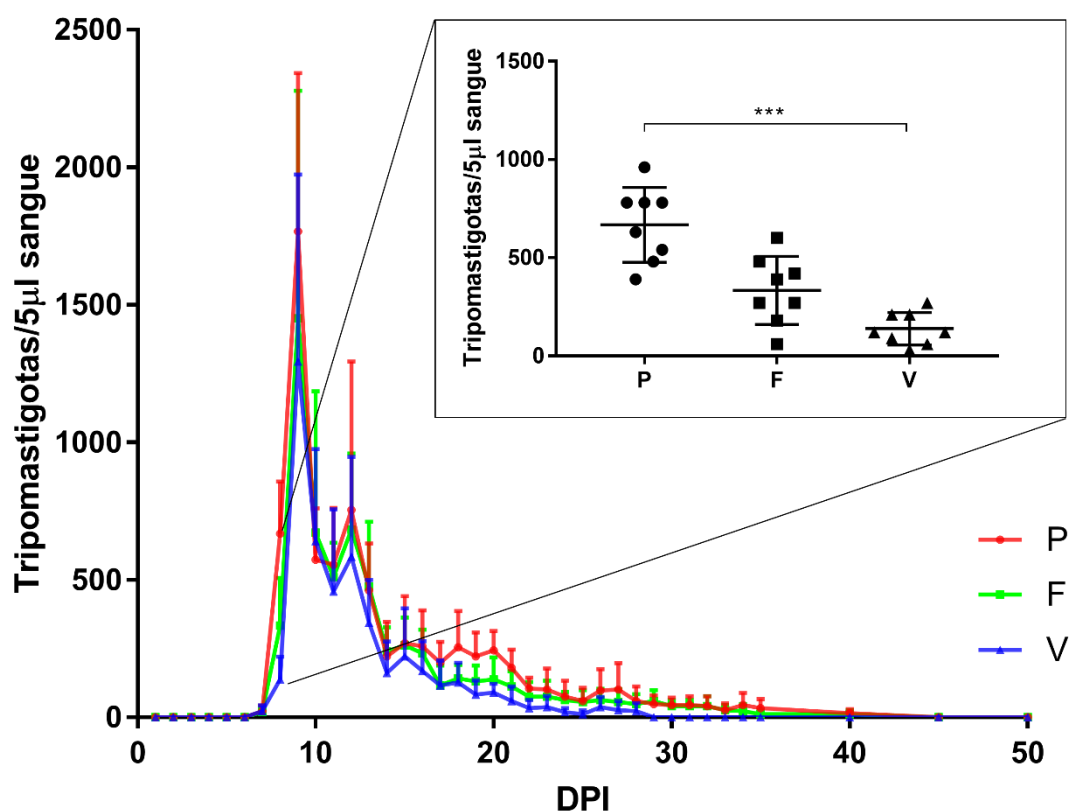


Figura 25. Parasitemia de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por *T. cruzi* cepa Y. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). Em destaque, parasitemia do 8º dia pós infecção, evidenciando 80% de redução de carga parasitária entre grupos vacinado e controle. Os resultados são expressos como número de tripomastigotas circulantes em 5 µL de sangue. Os dados foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

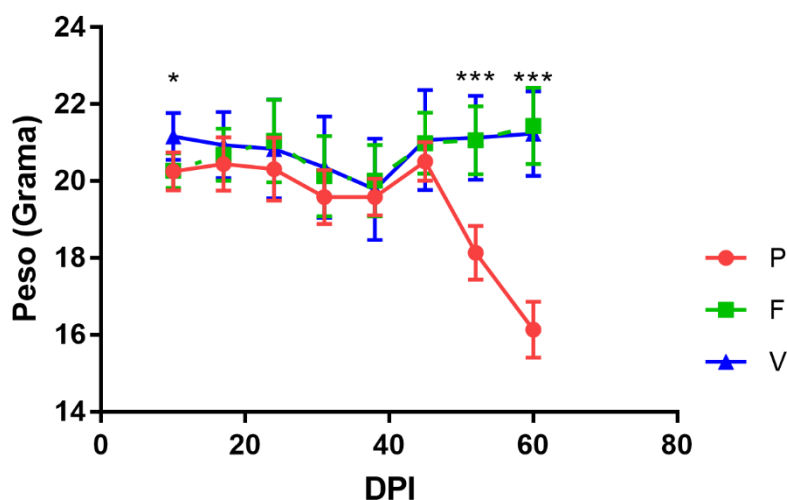


Figura 26. Peso de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por *T. cruzi* cepa Y, durante fase parasitêmica. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey ou utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Durante a fase crônica da infecção, a imunização foi capaz de reduzir a carga parasitária no intestino dos grupos que receberam o fago selvagem (~70%) e a vacina (~39%) (Figura 27A). Por outro lado, a carga parasitária no coração do grupo que recebeu fago selvagem foi consideravelmente maior quando comparada aos grupos controle e vacinado (Figura 27B).

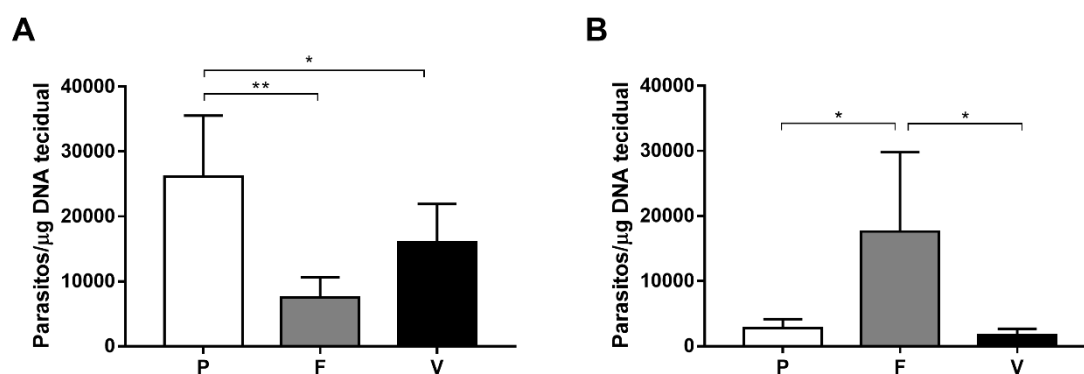


Figura 27. Carga parasitária do (A) intestino e (B) coração de animais imunizados e desafiados por *T. cruzi* cepa Y, obtida por PCR quantitativa. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). Os resultados são expressos como número de parasitos detectados por micrograma de DNA tecidual analisado. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Os resultados

são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.2.4 Análises histopatológicas

5.2.4.1 Descrição histopatológica do baço

A análise histopatológica descreveu os aspectos morfológicos do baço dos camundongos pertencentes aos grupos apenas vacinados (PBS, fago selvagem ou vacina) e vacinados e desafiados por *L. infantum* (Figura 28).

Em relação aos grupos apenas vacinados, a avaliação do baço dos camundongos pertencentes ao grupo PBS revelou aspecto habitual do órgão com preservação da arquitetura da polpa branca e polpa vermelha, sem alterações morfológicas (Figura 28A-B). Por outro lado, o baço dos camundongos que receberam fago selvagem (Figura 28C-D) e vacina (Figura 28E-F) apresentou hipertrofia e hiperplasia de alguns nódulos linfáticos, com proliferação de regiões B e T dependentes e ativação de centro germinativo.

Em relação aos camundongos vacinados e desafiados, a análise do baço do grupo PBS evidenciou hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides com proliferação de regiões B dependentes, presença de intenso infiltrado inflamatório na polpa vermelha, composto por macrófagos e linfócitos. Alguns macrófagos apresentaram hemossiderina no citoplasma, e por vezes foram encontrados macrófagos com amastigotas em seu interior (Figura 28G-H). Os mesmos achados histopatológicos foram encontrados no baço dos camundongos pertencentes ao grupo fago selvagem (Figura 28I-J). O baço dos camundongos pertencentes ao grupo vacina foi caracterizado por frequente hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides, com proliferação de regiões B dependentes. Alguns animais exibiram infiltrado inflamatório de intensidade moderada a intenso na polpa vermelha, composto por macrófagos e linfócitos (Figura 28K-L).

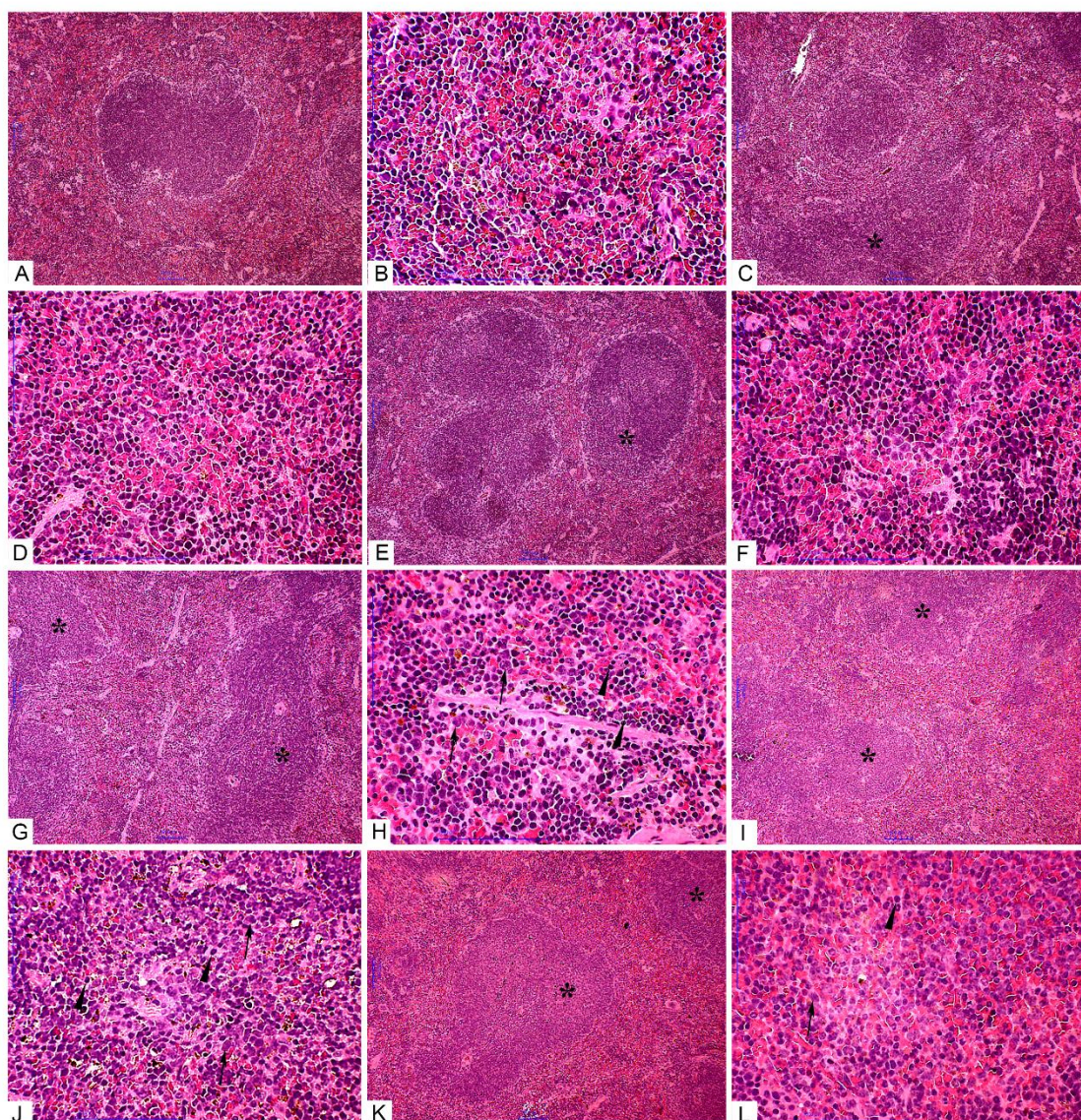


Figura 28. Fotomicrográfica do corte histológico do baço de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-LI, F-LI, V-LI) por *L. infantum*, 155 dias pós-infecção. (A) Grupo P: Imagem panorâmica do corte histológico do baço apresentando aspecto habitual; (B) Grupo P: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes da região de polpa vermelha; (C) Grupo F: Imagem panorâmica do corte histológico do baço apresentando hipertrofia e hiperplasia de folículos linfoides (*); (D) Grupo F: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes da região de polpa vermelha; (E) Grupo V: Imagem panorâmica do corte histológico do baço exibindo hipertrofia e hiperplasia de folículos linfoides (*); (F) Grupo V: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes da região de polpa vermelha; (G) Grupo P-LI: Imagem panorâmica do corte histológico do baço, apresentando folículo linfoide hipertrofiado e hiperplasiado (*); (H) Grupo P-LI: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes, intenso infiltrado inflamatório na polpa vermelha, compostos por macrófagos (setas) e linfócitos (cabeças de setas); (I) Grupo F-LI: Imagem panorâmica do corte histológico do baço, apresentando folículo linfoide hipertrofiado e hiperplasiado (*); (J) Grupo F-LI: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes, intenso infiltrado inflamatório na polpa vermelha, compostos por macrófagos (setas) e linfócitos (cabeças de setas); (K) Grupo V-LI: Imagem panorâmica do corte histológico do baço apresentando folículo linfoide hipertrofiado e hiperplasiado (*); (L) Grupo V-LI: Maior aumento da imagem anterior mostrando detalhes, com infiltrado inflamatório composto por macrófagos (setas) e linfócitos (cabeça de seta). Coloração hematoxilina & eosina; barra=1000µm.

5.2.4.2 Descrição histopatológica do fígado e avaliação de score de inflamação

A análise histopatológica descreveu os aspectos morfológicos do fígado dos camundongos pertencentes aos grupos apenas vacinados (PBS, fago selvagem ou vacina) e vacinados e desafiados. Nos grupos desafiados foi possível observar a topografia, infiltrados inflamatórios e fenômenos vasculares e exsudativos, assim como as lesões do parênquima hepático ocasionadas pela infecção por *L. infantum* (Figura 29).

A avaliação do parênquima hepático dos camundongos apenas vacinados demonstrou que os hepatócitos mantiveram aspecto morfológico normal, sem alterações patológicas. Os lóbulos hepáticos exibiram espaço porta preservado com ramos da artéria hepática, da veia porta, dos ductos biliares e vasos linfáticos íntegros. Os capilares sinusoides também apresentaram aspecto condizente com a normalidade (Figura 29A-C).

Em relação aos grupos vacinados e desafiados, a avaliação do fígado dos camundongos pertencentes ao grupo PBS evidenciou degeneração hidrópica em alguns hepatócitos e presença de focos de infiltrado inflamatório linfocitário. Algumas células de Kupffer apresentaram-se com hiperplasias. Frequentemente foram observados capilares sinusoides congestionados, com aumento discreto de linfócitos no leito capilar (Figura 29D). Os mesmos achados histopatológicos foram encontrados no parênquima hepático dos camundongos pertencentes ao grupo fago selvagem (Figura 29E). Em contrapartida, a análise histopatológica do parênquima hepático dos camundongos do grupo vacina identificou, em alguns animais, pequenos focos de infiltrado inflamatório e raras células de Kupffer com hiperplasia. Não foi evidenciada congestão de capilares sinusoidais (Figura 29F).

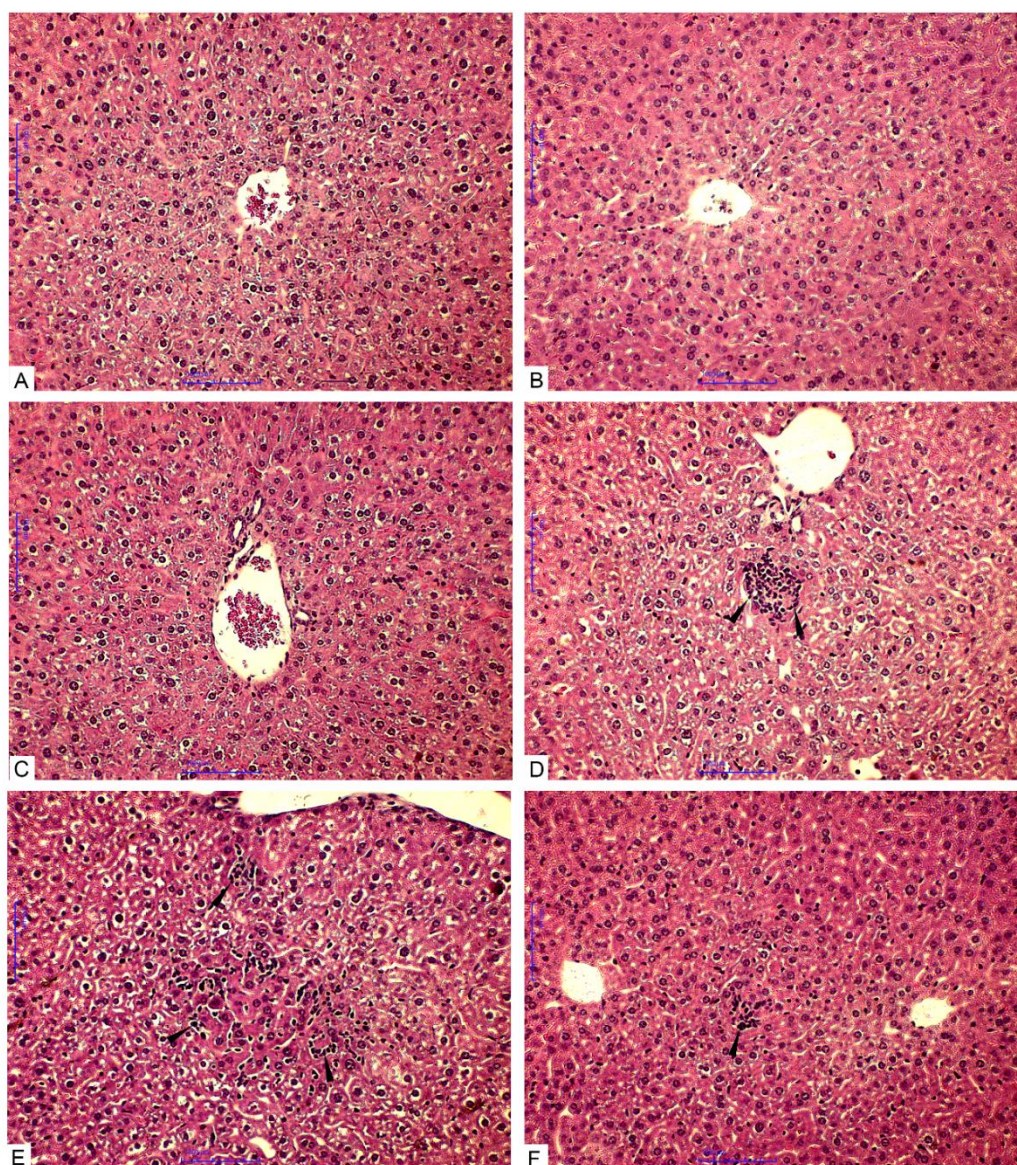


Figura 29. Fotomicrográfica do corte histológico do fígado de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-LI, F-LI, V-LI) por *L. infantum*, 155 dias pós-infecção. (A) Grupo P: Parênquima hepático exibindo aspecto habitual; (B) Grupo F: Parênquima hepático exibindo aspecto habitual; (C) Grupo V: Parênquima hepático exibindo aspecto condizente com a normalidade; (D) Grupo P-LI: Parênquima hepático apresentando foco inflamatório (cabeças de setas); (E) Grupo F-LI: Parênquima hepático exibindo foco inflamatório (cabeças de setas); (F) Grupo V-LI: Parênquima hepático apresentando pequeno foco inflamatório (cabeças de setas). Coloração hematoxilina & eosina; barra=1000µm.

O score de inflamação do parênquima hepático demonstrou que a maioria dos animais que receberam solução salina/PBS e fago selvagem apresentaram grau 1 de inflamação, caracterizado pela presença de regiões com poucas células inflamatórias. Nestes grupos também foram encontrados animais apresentando grau 2 de inflamação, exibindo infiltrado difuso e perivascular, além de pequenas áreas de necrose. Por outro lado, na maioria dos animais vacinados houve ausência de células inflamatórias no tecido hepático, com apenas dois animais apresentando grau 1 de inflamação (Figura 30).

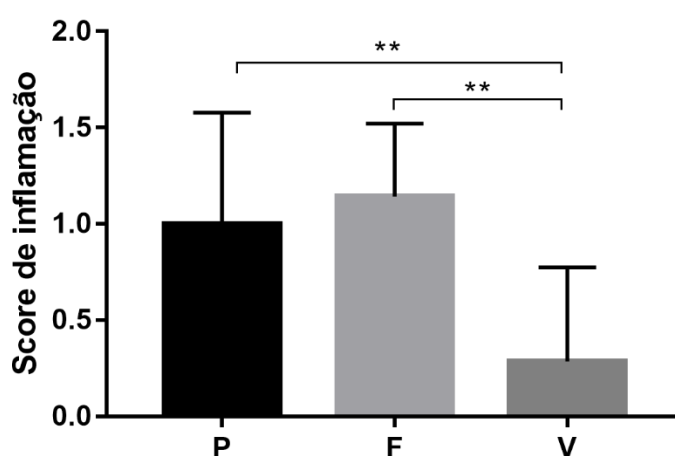


Figura 30. Score das lesões hepáticas de animais imunizados e desafiados por *L. infantum*, baseado em quatro graus de inflamação do parênquima. Grau 0: Ausência de células inflamatórias; Grau 1: Inflamação discreta; Grau 2: Inflamação moderada; Grau 3: Inflamação acentuada. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). Os dados foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.2.4.3 Descrição histopatológica da lesão cutânea presente no coxim plantar

A análise histopatológica da pata esquerda dos camundongos apenas vacinados (PBS, fago selvagem e vacina) observou a morfologia do tecido, enquanto que em animais vacinados e desafiados por *L. amazonensis* avaliou infiltrado inflamatório, tecido de granulação e danos celulares (Figura 31).

A análise histopatológica da pata dos camundongos apenas vacinados revelou morfologia habitual do coxim plantar, sem alterações morfológicas na epiderme, derme e muscular (Figura 31A-F).

Em relação aos animais vacinados e desafiados, a avaliação da pata dos camundongos pertencentes ao grupo PBS revelou infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, caracterizado majoritariamente por macrófagos, escassos linfócitos e polimorfonucleares. O infiltrado apresentou forma difusa, abrangendo epiderme, derme e muscular. Em sua maioria, os macrófagos apresentaram aumento do citoplasma em relação núcleo, repletos de amastigotas fagocitadas, que também foram facilmente encontradas no interstício. Foi possível identificar a presença de necrose abrangendo a derme e epiderme, por vezes associada a tecido de granulação. Nas regiões de corte histológico em que foi possível observar a epiderme preservada, esta apresentou acantose, evidenciada pelo aumento da camada espinhosa. O aumento das cristas intradérmicas também foi evidenciado na epiderme preservada. Algumas regiões da derme apresentaram proliferação discreta de fibroblastos e deposição de fibras colágenas (Figura 31G-H).

A análise histopatológica dos camundongos pertencentes ao grupo fago selvagem exibiu achados histopatológicos idênticos ao grupo PBS. O infiltrado inflamatório também apresentou aspecto difuso, caracterizado por macrófagos repletos de amastigotas. Entretanto, neste grupo foi possível observar maior quantidade de linfócitos em relação aos grupos PBS e vacina, além de escassos polimorfonucleares (Figura 31I-J).

A pata dos camundongos pertencentes ao grupo vacina apresentou os mesmos achados histopatológicos observados no grupo PBS. No entanto, três camundongos exibiram lesões menores. Na maior parte dos cortes analisados a lesão manteve-se restrita à epiderme, com áreas de debris celulares e necrose. Quando lesões foram identificadas na derme, esta apresentava-se menos exuberante, caracterizada por infiltrado de macrófagos e linfócitos. Alguns macrófagos encontravam-se parasitados. Associado ao infiltrado inflamatório, houve aumento da proliferação de tecido conjuntivo quando comparado aos outros grupos, disposto a formar feixes fibrosos e sugerindo remodelamento da lesão (Figura 31K-L).

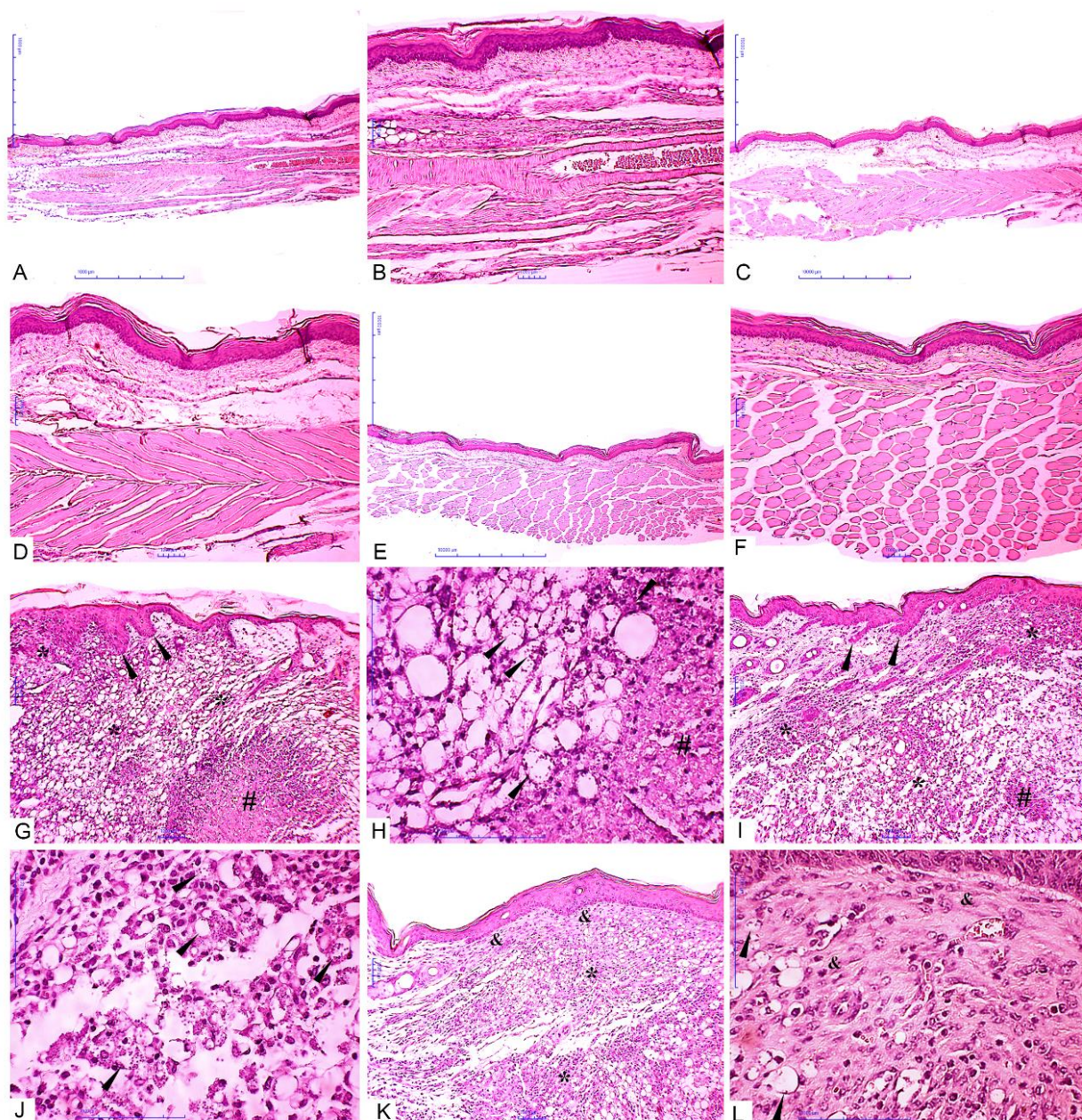


Figura 31. Fotomicrográfrica do corte histológico do coxim plantar de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-LA, F-LA, V-LA) por *L. amazonensis*, 13 semanas pós-infecção. (A) Grupo P: Imagem panorâmica do corte histológico do coxim plantar, com aspecto habitual; (B) Grupo P: Maior aumento da imagem anterior; (C) Grupo F: Imagem panorâmica do corte histológico do coxim plantar, com aspecto habitual; (D) Grupo F: Maior aumento da imagem anterior; (E) Grupo V: Imagem panorâmica do corte histológico do coxim plantar, com aspecto habitual; (F) Grupo V: Maior aumento da imagem anterior; (G) Grupo P-LA: Imagem panorâmica do corte histológico do coxim plantar, apresentando infiltrado inflamatório difuso (*), presença de cristas interpapilares (cabeças de seta), área de necrose (#); (H) Grupo P-LA: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes, macrófagos repletos de amastigotas (setas), área de necrose (#); (I) Grupo F-LA: Imagem panorâmica do corte histológico do coxim plantar, apresentando infiltrado inflamatório difuso (*), presença de cristas interpapilares (cabeças de seta), área de necrose (#); (J) Grupo F-LA: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes, macrófagos repletos de amastigotas (setas); (K) Grupo V-LA: Imagem

panorâmica do corte histológico do coxim plantar apresentando infiltrado inflamatório difuso (*) e proliferação de tecido conjuntivo (&); (L) Grupo V-LA: Maior aumento da imagem anterior mostrando detalhes, macrófagos com amastigotas (setas), proliferação de tecido conjuntivo (&). Coloração hematoxilina & eosina; barra=1000µm.

5.2.4.4 Descrição histopatológica do coração e avaliação de scores de inflamação e alterações degenerativas

A análise histopatológica do coração dos camundongos apenas vacinados (PBS, fago selvagem e vacina) observou aspectos morfológicos do órgão, enquanto a análise dos animais vacinados e desafiados por *T. cruzi* descreveu topologia, infiltrado inflamatório e alterações degenerativas presentes no miocárdio (Figura 32).

O coração dos camundongos apenas vacinados apresentou aspecto habitual do órgão, com preservação da arquitetura cardíaca e sem alterações patológicas (Figura 32A-C).

Por outro lado, o coração dos animais vacinados e desafiados por *T. cruzi* apresentou infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizado por linfócitos, distribuído de forma difusa pelo miocárdio. Frequentemente foram evidenciados cardiomiócitos apresentando alterações degenerativas, enquanto outros encontravam-se hipertrofiados. Foi possível evidenciar também a deposição discreta de fibras colágenas entre os feixes de fibras cardíacas. As alterações histopatológicas descritas acima foram encontradas com mais frequência nas regiões correspondentes ao átrio (Figura 32D-I).

A análise histopatológica revelou ausência de ninhos de amastigotas nos animais infectados.

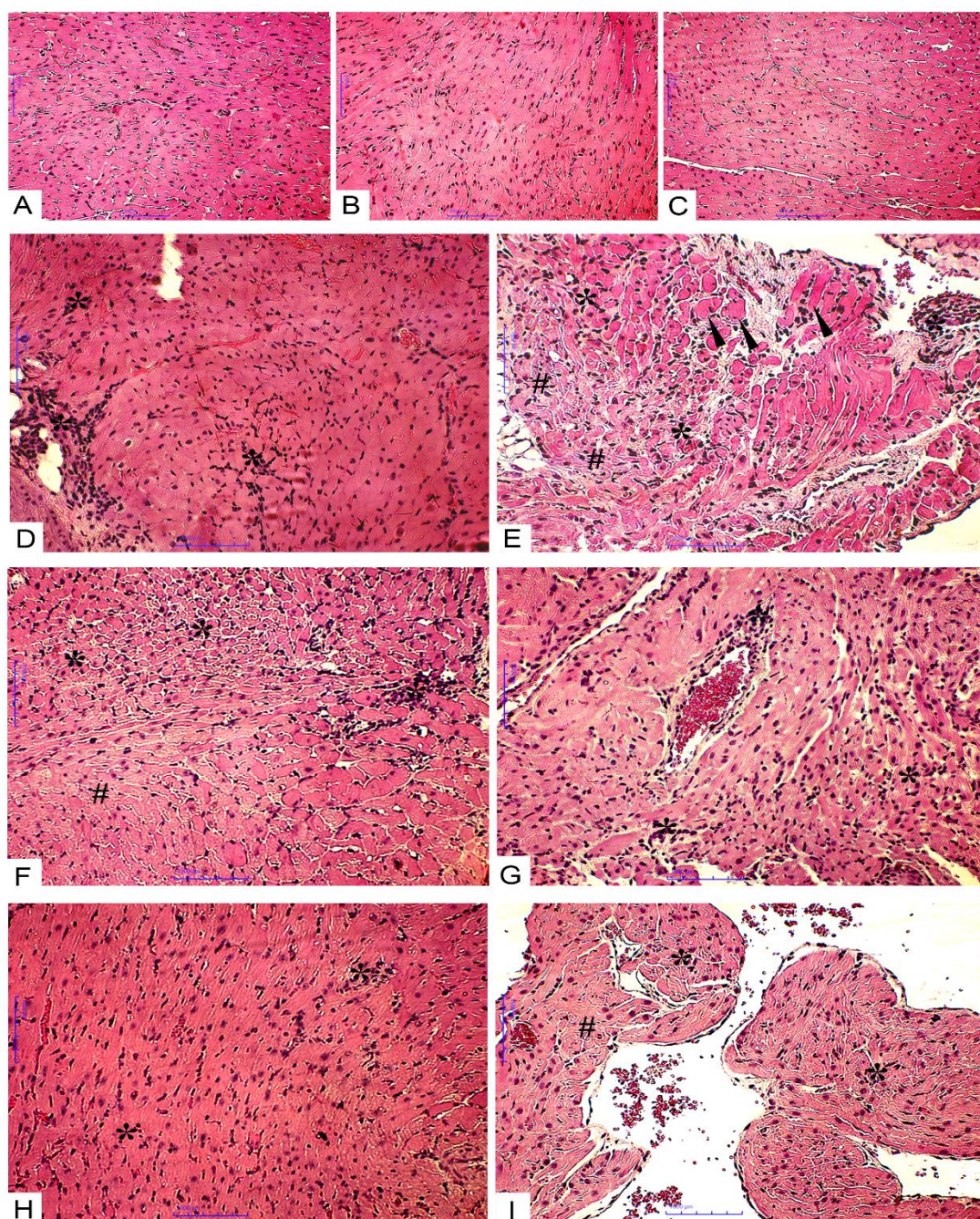


Figura 32. Fotomicrográfrica do corte histológico do coração de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-TC, F-TC, V-TC) por *T. cruzi*, 60 dias pós infecção. (A) Grupo P: Corte histológico do coração apresentando aspecto habitual. (B) Grupo F: Corte histológico do coração apresentando aspecto habitual. (C) Grupo V: Corte histológico do coração com aspecto morfológico condizente com a normalidade. (D) Grupo P-TC: Corte histológico do coração, região ventricular exibindo infiltrado inflamatório difuso (*). (E) Grupo P-TC: Corte histológico do coração, região atrial exibindo infiltrado inflamatório difuso (*), região com cardiomiócitos exibindo alterações degenerativas (#), cardiomiócitos hipertrofiados (cabeças de setas). (F) Grupo F-TC: Corte histológico do coração, região ventricular exibindo infiltrado inflamatório difuso (*), cardiomiócitos exibindo alterações degenerativas (#). (G) Grupo F-TC: Corte histológico do coração, região atrial exibindo infiltrado inflamatório difuso (*). (H) Grupo V-TC: Corte histológico do coração, região ventricular exibindo discreto infiltrado inflamatório difuso (*). (I) Grupo V-TC: Corte histológico do coração, região atrial

exibindo infiltrado inflamatório difuso (*), alguns cardiomiócitos apresentam alterações degenerativas (#). Coloração hematoxilina & eosina; barra=1000µm.

O score de inflamação do miocárdio foi semelhante para os três grupos analisados, sem diferença significativa entre eles. No entanto, todos os animais que receberam solução salina/PBS e fago selvagem apresentaram grau 3 de inflamação, enquanto houve alguns animais vacinados que exibiram graus 2 e 1 de inflamação (Figura 33A). Ademais, houve maior incidência de alterações degenerativas e células em autólise em animais dos grupos PBS e fago selvagem em relação aos animais vacinados (Figura 33B).

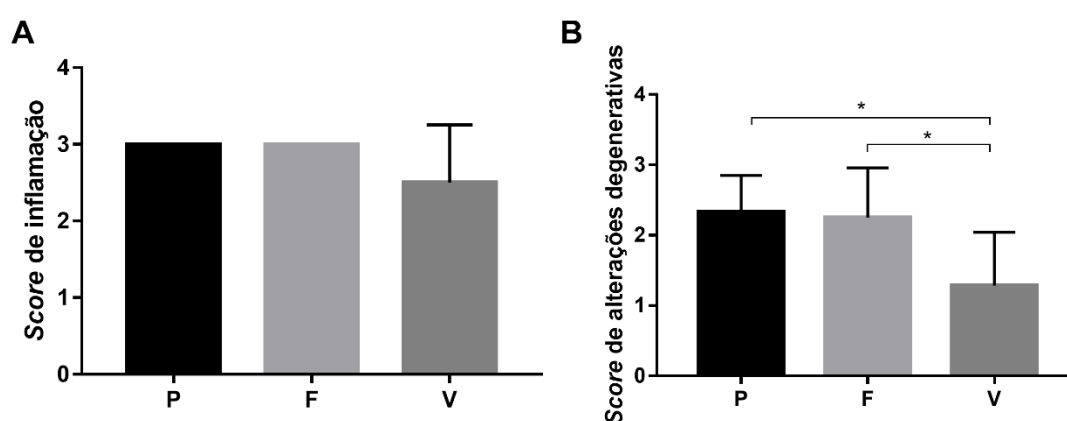


Figura 33. Scores de inflamação no miocárdio (A) e de alterações degenerativas (B) de animais imunizados e desafiados por *T. cruzi*, baseado em quatro graus de intensidade. Grau 0: Ausência de células inflamatórias ou degeneração; Grau 1: Inflamação ou degeneração discreta; Grau 2: Inflamação ou degeneração moderada; Grau 3: Inflamação ou degeneração acentuada. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak ou utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.2.4.5 Descrição histopatológica do intestino e avaliação de score de inflamação

A análise histopatológica do colón dos camundongos apenas vacinados (PBS, fago selvagem e vacina) observou a morfologia do órgão, enquanto que nos animais vacinados e desafiados por *T. cruzi* descreveu a topografia e infiltrado inflamatório (Figura 34).

A avaliação do cólon dos camundongos apenas vacinados constatou aspecto histológico habitual, sem alterações patológicas (Figura 34A-F).

O cólon dos camundongos vacinados e desafiados apresentou lesões intestinais, caracterizadas por infiltrado inflamatório presente na mucosa, submucosa, muscular e por vezes na serosa. Houve predomínio de linfócitos e escassos neutrófilos. O infiltrado inflamatório apresentou intensidade de leve a moderada no grupo que recebeu PBS e de moderada a intensa nos grupos que receberam fagos selvagem e vacina, com distribuição difusa e multifocal mais evidente na submucosa e muscular. Em algumas regiões da submucosa também foi evidenciada a presença de edema exsudado. Ademais, foi observado infiltrado em plexos nervosos na submucosa e na muscular, caracterizando ganglionite. Nos grupos que receberam PBS e fago selvagem a camada muscular do intestino nas regiões com maior infiltrado inflamatório apresentou-se espessada, devido a hipertrofia e hiperplasia de leiomiócitos. Em todos os grupos foi possível observar a ativação de folículo linfoide na mucosa intestinal (Figura 34G-L).

O *score* de inflamação das lesões intestinais refletiu o que foi observado durante a descrição histopatológica, de modo que os animais imunizados com fago selvagem e vacina apresentaram maior grau de inflamação quando comparados ao grupo PBS. Apesar de não haver diferença significativa, todos os animais que foram imunizados com fago selvagem apresentaram *score* com grau 3, enquanto os animais vacinados exibiram graus 2 e 3 (Figura 35).

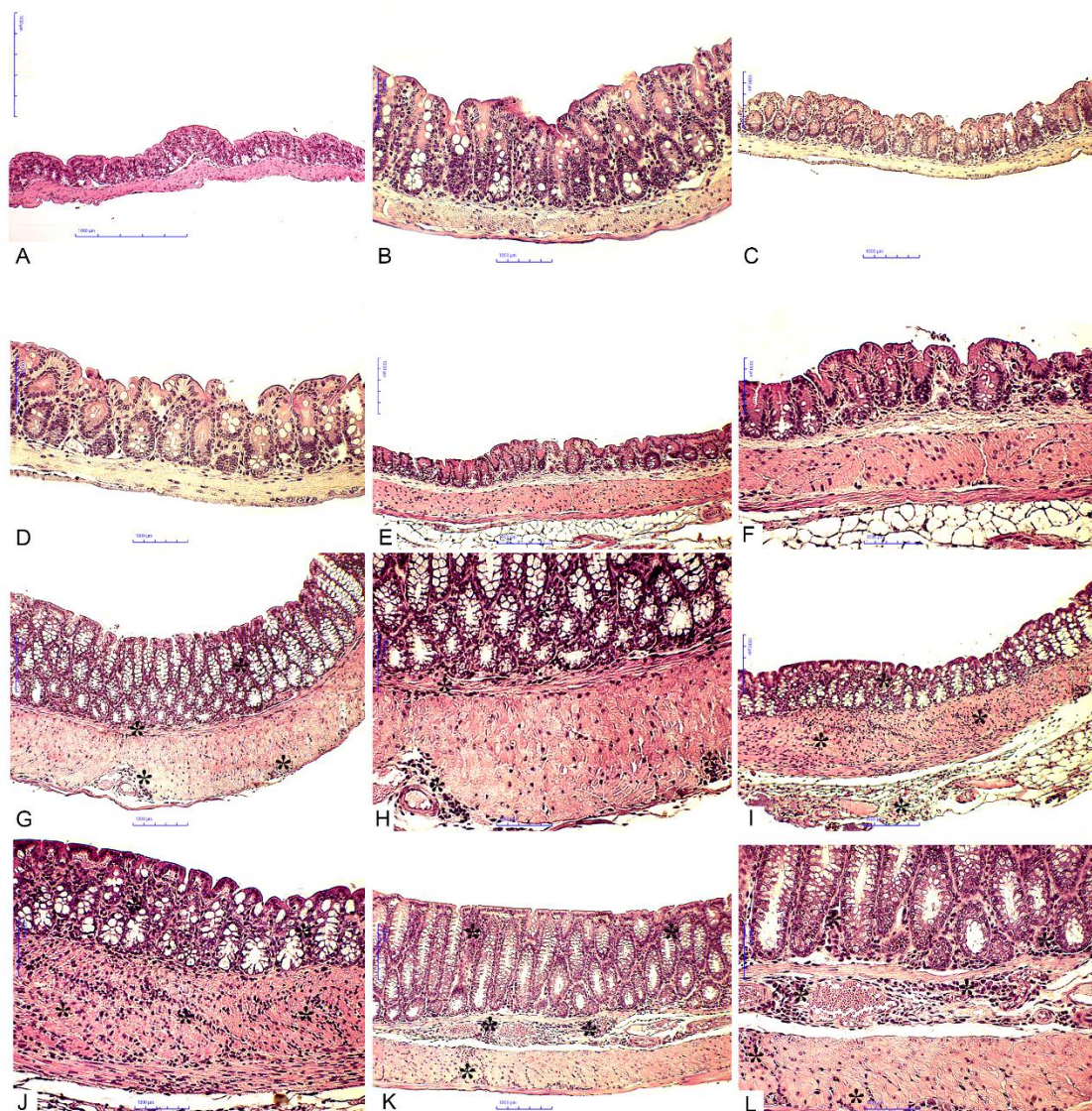


Figura 34. Fotomicrográfrica do corte histológico do intestino de camundongos apenas vacinados (P, F, V) e vacinados e desafiados (P-TC, F-TC, V-TC) por *T. cruzi*, 60 dias pós-infecção. (A) Grupo P: Imagem panorâmica do corte histológico do colón; (B) Grupo P: Maior aumento da imagem anterior; (C) Grupo F: Imagem panorâmica do corte histológico do colón; (D) Grupo F: Maior aumento da imagem anterior; (E) Grupo V: Imagem panorâmica do corte histológico do colón; (F) Grupo V: Maior aumento da imagem anterior; (G) Grupo P-TC: Imagem panorâmica do corte histológico do colón, apresentando infiltrado inflamatório difuso na mucosa, submucosa, muscular (*); (H) Grupo P-TC: Maior aumento da imagem anterior apresentando detalhes do infiltrado inflamatório na mucosa, submucosa, muscular (*); (I) F-TC: Imagem panorâmica do corte histológico do colón, apresentando infiltrado inflamatório difuso na mucosa, submucosa, muscular e serosa (*); (J) Grupo F-TC: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes do infiltrado inflamatório presente na mucosa, submucosa, muscular e serosa (*); (K) Grupo V-TC: Imagem panorâmica do corte histológico do colón, apresentando infiltrado inflamatório difuso na mucosa, submucosa, muscular (*); (L) Grupo V-TC: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes do infiltrado inflamatório presente na mucosa, submucosa, muscular (*); Coloração hematoxilina & eosina; barra=1000µm.

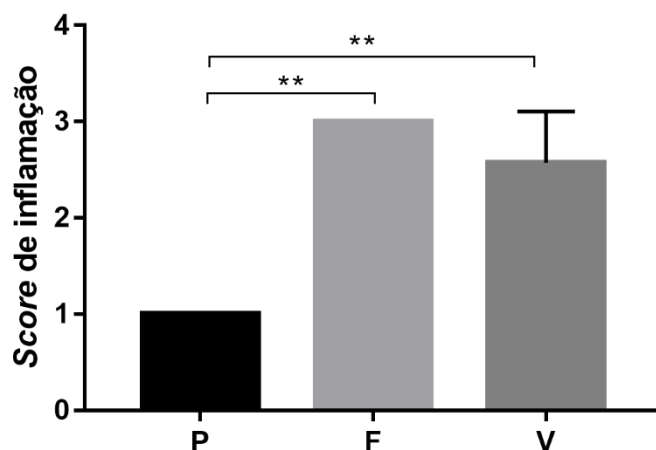


Figura 35. Score das lesões intestinais de animais imunizados e desafiados por *T.cruzi*, baseado em quatro graus de inflamação. Grau 0: Ausência de células inflamatórias; Grau 1: Inflamação discreta; Grau 2: Inflamação moderada; Grau 3: Inflamação acentuada. Os grupos receberam solução salina/PBS (P), fago selvagem (F) ou vacina (V). Os dados foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como a média \pm SD e os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.3 CAPÍTULO 3: Perspectivas - Construção de uma vacina viva multicompetente, imunogênica, eficaz e segura

Os dados obtidos neste capítulo foram gerados durante período de doutorado sanduíche realizado na *Ohio State University* (EUA), sob a supervisão do Dr. Abhay Satoskar.

A clonagem das sequências de interesse no vetor pUC57 foi confirmada tanto por eletroforese em gel de agarose como por sequenciamento, pela empresa Macrogen. É importante destacar que a mesma sequência foi clonada alternativamente com diferentes enzimas de restrição em suas extremidades, a fim de estimular expressão proteica citosólica (sequência Cyt) e secretória (sequência Sec) pelos parasitos transfectados.

A digestão dos vetores pLEXSY-ble2.1 e pUC57 resultou em bandas de tamanho esperado (Tabela 5), o que foi confirmado por eletroforese em gel de agarose (Figura 36). As canaletas 3 e 4 mostram a digestão do vetor pLEXSY-ble2.1 com os pares de enzima XbaI + KpnI e BglII + KpnI, respectivamente. As canaletas 5 e 6 evidenciam a digestão do vetor pUC57 com as mesmas enzimas. As bandas correspondentes aos plasmídeos pLEXSY linearizados (8045pb e 7959 pb) e às sequências Sec (588 pb) e Cyt (591 pb) foram excisadas do gel e tiveram o DNA extraído.

Tabela 5. Tamanhos de bandas esperados (pb) após digestão dos plasmídeos pLEXSY-ble2.1 e pUC57 com os pares de enzimas de restrição XbaI + KpnI e BglII + KpnI.

Plasmídeo	Enzimas de restrição	Tamanho das bandas
pLEXSY-ble2.1	XbaI + KpnI	pLEXSY (8045 pb) + Stuffer (1000 pb)
pLEXSY-ble2.1	BglII + KpnI	pLEXSY (7959 pb) + Stuffer (1086 pb)
pUC57-Sec	XbaI + KpnI	pUC57 (2710 pb) + Stuffer (588 pb)
pUC57-Cyt	BglII + KpnI	pUC57 (2710 pb) + Stuffer (591 pb)

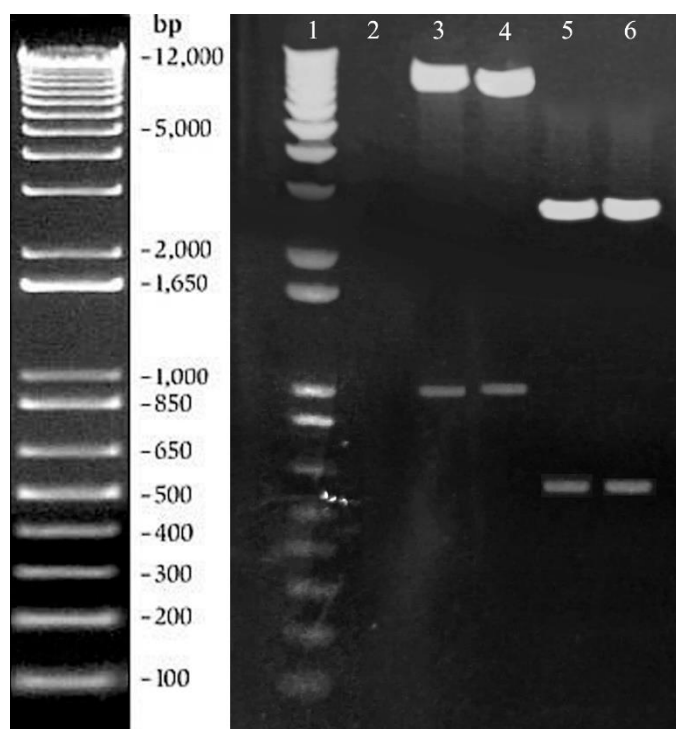


Figura 36. Eletroforese em gel de agarose após digestão dos plasmídeos pLEXYble-2.1 e pUC57 com os pares de enzimas de restrição XbaI + KpnI e BglII + KpnI. Padrão molecular 1kb plus (Invitrogen). Canaletas 1: Padrão molecular; 2: Reação controle; 3: pLEXYble-2.1 digerido com XbaI + KpnI; 4: pLEXYble-2.1 digerido com BglII + KpnI; 5: pUC57-Sec digerido com XbaI + KpnI; 6: pUC57-Cyt digerido com BglII + KpnI. Gel de agarose a 0,7%.

Após ligação das sequências de interesse no vetor pLEXY-ble2.1, linearização e esterilização do vetor, a transfecção foi realizada com sucesso. As culturas em meio líquido foram mantidas por 18 dias, sob pressão do antibiótico bleomicina, até a morte dos parasitos não transfectados (mock). A seleção clonal foi realizada em seguida. As primeiras colônias começaram a aparecer 10 dias após a semeadura em meio sólido, momento em que foram isoladas e expandidas novamente em meio líquido. Após duas passagens em meio líquido, os parasitos foram congelados e mantidos em nitrogênio líquido.

6 DISCUSSÃO

Um elemento central da técnica de *phage display* é a seleção por afinidade, de modo que a escolha do ligante é fundamental para a obtenção de sequências que preencham os requisitos necessários ao objetivo inicial. A maioria dos trabalhos que utilizaram o *phage display* para o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses selecionaram seus candidatos a partir da sua afinidade por imunoglobulinas presentes no soro de cães ou indivíduos naturalmente infectados (CARVALHO *et al.*, 2018; CHÁVEZ-FUMAGALLI, 2008; COSTA *et al.*, 2014; DIAS, 2016; RAMOS *et al.*, 2017; TOLEDO-MACHADO; DE AVILA; *et al.*, 2015). É importante destacar, neste contexto, a heterogeneidade da resposta imune destes organismos, possivelmente influenciada por fatores como endemicidade, diversidade genética, espécie infectante e tempo de infecção (DUNNING, 2009). Apesar dos candidatos serem triados posteriormente por ensaios *in vitro* que avaliam sua especificidade e capacidade de estimular células do sistema imune, estes resultados não refletem necessariamente o potencial protetor destes peptídeos. Considerando esta possível limitação, utilizamos a cepa mutante de *L. donovani* deficiente para o gene da centrina (*LdCEN*^{-/-}) para produção de anticorpos.

A imunogenicidade da cepa *LdCEN*^{-/-} foi descrita em ensaios vacinais envolvendo camundongos, hamsters e cães, caracterizada pela ativação de células CD4⁺ e CD8⁺, produção de citocinas do perfil Th1 e indução de altos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a específicos (FIUZA *et al.*, 2013, 2015; SELVAPANDIYAN, A. *et al.*, 2009). Apesar de estar bem estabelecido que a proteção contra *Leishmania* é dependente uma resposta robusta e específica de células T, já foi demonstrado que a produção de anticorpos específicos também pode estar associada a um perfil protetor (ROSTAMIAN *et al.*, 2017; WOELBING *et al.*, 2006). Ressalta-se, ainda, que células B podem ser ativadas por antígenos apresentados por células T, de forma que a produção de anticorpos por este plasmócito reflète a resposta celular induzida pelo mesmo epitopo (JANEWAY *et al.*, 2001). Baseado neste raciocínio, infectamos camundongos BALB/c três vezes com a cepa *LdCEN*^{-/-}, a fim de obter imunoglobulinas específicas com potencial perfil protetor. Assim, cada infecção gerou aumento gradual e significativo da produção de IgG total (Figura 9A).

Através de uma estratégia diferente, a seleção de sequências específicas para *T. cruzi* foi baseada na qualidade das imunoglobulinas produzidas por um hospedeiro

resistente à infecção. Em 1912 foi demonstrado que camundongos que sobreviviam à fase aguda da infecção por *T. cruzi* tornavam-se resistentes à reinfecção (RODRÍGUEZ-MORALES *et al.*, 2015). Além da expansão de células T CD4⁺ e CD8⁺ e a produção de citocinas pró-inflamatórias, níveis de anticorpos líticos elevados caracterizam a resposta imune protetora nesta infecção (CARDILLO *et al.*, 2015; PARODI; PADILLA; BASOMBRÍO, 2009; RIOS *et al.*, 2019). Fenótipos de resistência e suscetibilidade associados à indução de respostas Th1 ou Th2 foram extensamente descritos através de estudos com as linhagens de camundongo C57BL/6 e BALB/c, respectivamente (GUIÑAZÚ *et al.*, 2004; TRISCHMANN, 1986; WATANABE *et al.*, 2004). Apesar de citocinas do padrão Th2 estarem comumente relacionadas ao aumento de anticorpos policlonais, uma resposta humoral parasito-específica está associada com a expansão diferencial de células B e T, assim como ao aumento de citocinas Th1 (BRYAN; GUYACH; NORRIS, 2010). Desta forma, infectamos camundongos C57BL/6 com o objetivo de obtermos imunoglobulinas específicas. Como esperado, a reinfecção promoveu um aumento da produção de IgG (Figura 9B), inclusive em uma escala superior ao observado pela infecção por *LdCEN*^{-/-}.

Estas imunoglobulinas foram purificadas e utilizadas para seleção de peptídeos através da técnica *phage display*. O método mais comum de triagem das bibliotecas de fagos é a seleção de clones através da sua afinidade de ligação a uma determinada molécula, como as imunoglobulinas (WILLATS, 2002). Após seleção os clones são amplificados e utilizados como bibliotecas mais restritas em novos ciclos de triagem, a fim de aumentar sucessivamente sua especificidade (PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010). Este enriquecimento seletivo de clones com alta afinidade e especificidade ao ligante pode ser obtido de diversas maneiras, como a redução de concentração das imunoglobulinas a cada novo ciclo (AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2016), método utilizado neste trabalho. No entanto a seleção bem-sucedida de um peptídeo está relacionada não somente à sua afinidade de ligação, mas sobretudo à diversidade inicial da biblioteca utilizada (DERDA *et al.*, 2011). Diversos estudos demonstraram que a amplificação de bibliotecas de fagos é responsável pela perda significativa da sua diversidade (KUZMICHEVA *et al.*, 2009; MATOCHKO *et al.*, 2014; RODI; MAKOWSKI, 1999; RODI; SOARES; MAKOWSKI, 2002). Isto ocorre devido ao crescimento competitivo entre clones com diferentes *fitness*, uma vez que

determinadas sequências podem reduzir a taxa de replicação viral enquanto outras conferem vantagem adaptativa (RODI; MAKOWSKI, 1999).

É possível, então, que clones com alta afinidade ao ligante tenham uma taxa de crescimento reduzida, de forma que sua representatividade na biblioteca seja reduzida devido ao crescimento exacerbado de fagos com baixa afinidade. A perda de especificidade observada no terceiro ciclo de seleção com a IgG anti-*LdCEN*^{-/-} (Figura 13A) pode ser explicada por esses fatores. Por outro lado, este fenômeno não foi observado durante a triagem em que utilizamos a IgG anti-*T. cruzi* (Figura 13B). Neste caso, a alta afinidade da imunoglobulina aliada à maior representatividade de ligantes na biblioteca resultou na manutenção da especificidade observada no segundo e terceiro ciclo de seleção.

Os clones selecionados pela IgG anti-*LdCEN*^{-/-} (Figura 14A) exibiram baixa reatividade quando comparados aos clones selecionados pela IgG anti-*T. cruzi* (Figura 14B), o que foi demonstrado durante o processo de triagem. Ao utilizarem a mesma biblioteca de fagos deste estudo, Chávez-Fumagalli (2008) e Toledo-Machado et al. (2015) selecionaram clones com reatividade superior à exibida pelos clones de *LdCEN*^{-/-} e inferior aos clones de *T. cruzi*. Estes autores utilizaram IgG específica purificada do soro de cães naturalmente infectados por *L. infantum* para triar seus candidatos, o que destaca mais uma vez a influência do tipo de ligante na seleção por *phage display*. Apesar da baixa reatividade, os peptídeos de *LdCEN*^{-/-} sintetizados em membrana de celulose foram reconhecidos pelo soro anti-*LdCEN*^{-/-} e anti-*T. cruzi* (Figura 15). Este tipo de síntese imobiliza sequências peptídicas lineares em diferentes tipos de membrana, permitindo a identificação de epitopos e mimotopos e a visualização da intensidade de interação entre estas sequências e outras moléculas (FRANK, 2002). De acordo com os resultados obtidos por *immunoblot*, os peptídeos 1, 2, 3, 4 e 7 apresentaram sororeatividade para IgG anti-*LdCEN*^{-/-} e 4, 6 e 7 foram reconhecidos pela IgG anti-*T. cruzi*. A análise deste reconhecimento, no entanto, deve considerar uma consequência inerente à síntese em membrana: a perda de potenciais epitopos conformacionais.

Epitopos conformacionais ou descontínuos são aqueles formados por fragmentos peptídicos dispersos ao longo de uma sequência proteica, que se aproximam espacialmente após o dobramento da proteína (VAN REGENMORTEL, 2001). Apesar de serem frequentemente compostos por pequenas sequências

contínuas, a maioria dos epitopos apresentam caráter descontínuo. De fato, estima-se que cerca de 90% dos epitopos de célula B tenham natureza conformacional (FERDOUS *et al.*, 2019; VAN REGENMORTEL, 2001). Um dos principais atrativos do *phage display* é a possibilidade de selecionar este tipo de epitopo, o que é possível devido a exploração da própria biologia dos fagos filamentosos. Antes de serem incorporadas ao capsídeo viral, as sequências peptídicas exógenas fusionadas às proteínas PIII ou PVIII são transportadas para o espaço periplasmático (RODI; MAKOWSKI, 1999). Neste ambiente oxidante, resíduos de cisteína presentes no peptídeo podem formar pontes dissulfeto responsáveis pelo surgimento de epitopos conformacionais (SMITH; PETRENKO, 1997).

Duas das bibliotecas (12aa; XCX₈CX e 17aa; X₈CX₈) utilizadas neste trabalho foram desenhadas de forma que seus peptídeos contivessem resíduos de cisteína em posições fixas da sua sequência, a fim de induzir seu estado conformacional. A terceira biblioteca (15aa; X₁₅), por outro lado, não apresenta nenhuma restrição e, na ausência de cisteínas fixas, exhibe epitopos lineares com maior frequência. Nesse sentido, é interessante observar que três das quatro sequências que apresentaram correspondência com proteínas de *Leishmania* (Tabela 4) foram selecionadas a partir da biblioteca com peptídeos de 15 aminoácidos, evidenciando a natureza linear dos seus epitopos. As demais sequências não foram identificadas como parte do proteoma de *Leishmania*, sendo consideradas, portanto, mimotopos. Assim, considerando as características das bibliotecas utilizadas e a limitação conformacional da síntese em membrana, a reatividade destes peptídeos frente às IgG específicas pode não refletir necessariamente seu real potencial como candidatos vacinais.

Tendo em vista esta limitação, os peptídeos selecionados para *LdCEN*^{-/-} e *T. cruzi* foram sintetizados em forma solúvel, a fim de permitir que assumissem sua estrutura nativa. Apesar de terem sido selecionados por anticorpos específicos para uma cepa geneticamente deficiente de *L. donovani* (*LdCEN*^{-/-}) ou para *T. cruzi*, os peptídeos foram reconhecidos majoritariamente por anticorpos de animais infectados por *L. amazonensis*. Em contrapartida, nenhum peptídeo foi reconhecido pelo soro de animais infectados por *L. infantum* (Figura 16). Considerando que os soros utilizados neste ensaio foram obtidos de animais experimentalmente infectados em condições semelhantes, estas diferenças de reconhecimento podem estar refletindo a heterogeneidade da resposta imune frente às infecções por *Leishmania* spp.

(TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007). Até mesmo cepas diferentes da mesma espécie podem induzir resposta imune variável, como demonstrado por Almeida *et al.* (1996). Os autores relataram que a infecção experimental com cepas de *L. amazonensis* isoladas de casos cutâneos e mucocutâneos produziram níveis elevados de anticorpos específicos, enquanto a infecção com cepas isoladas de casos viscerais gerou níveis reduzidos de anticorpos (ALMEIDA *et al.*, 1996).

Outro aspecto a ser considerado é que peptídeos sintéticos produzidos a partir de sequências miméticas obtidas por *phage display* podem exibir estruturas diferentes quando não estão acoplados ao fago (MEOLA *et al.*, 1995). Assim, variações conformacionais podem influenciar no reconhecimento da sequência pelo mesmo anticorpo que a selecionou. O fato é que, independentemente da diversidade da resposta imune gerada por diferentes espécies/cepas e da limitação da técnica, todos os peptídeos foram reconhecidos por pelo menos um tipo de anticorpo avaliado, demonstrando seu potencial para integrar uma vacina multicompetente.

A vacina foi formulada com os dez clones de fagos expressando os peptídeos selecionados, sem acréscimo de adjuvantes, em inóculo de 10^{10} TU por imunização. Doses entre 10^9 a 10^{12} TU são capazes de induzir a produção de anticorpos em camundongos. No entanto, o aumento da concentração de fagos está relacionado com a produção de títulos mais elevados de anticorpo em um período menor, assim como o desenvolvimento de uma resposta mais específica direcionada aos mimotopos. De acordo com estas observações, um inóculo de 10^{10} TU é considerado suficiente para gerar uma resposta imune eficaz em modelos murinos (GALFRÈ *et al.*, 1996). Fagos filamentosos são considerados excelentes imunógenos, sendo explorados como carreadores de sequências antigênicas em diversos trabalhos (COSTA *et al.*, 2014, 2015; DE LA CRUZ; LAL; MCCUTCHAN, 1988; GREENWOOD; WILLIS; PERHAM, 1991; RAMOS *et al.*, 2017; SAMOYLOVA *et al.*, 2012).

A fusão de peptídeos de *Plasmodium falciparum* ao fago fd destacou a importância de fagos filamentosos como poderosos imunostimulantes, uma vez que a imunização com estes fagos híbridos induziu uma resposta específica dependente do recrutamento de células T, na ausência de adjuvantes (WILLIS; PERHAM; WRAITH, 1993). Um fator importante que contribui para este caráter imunostimulatório é a presença de ilhas CpG no genoma viral. Estas sequências são conhecidas por ativar a resposta imune inata através da interação com receptores do

tipo Toll (HESS; JEWELL, 2019; MASON *et al.*, 2005), induzindo a produção de citocinas inflamatórias e recrutando fagócitos para o local da infecção, dando início assim à expansão de células T via MHC de classe I e II (GAUBIN *et al.*, 2003; HEEG; ZIMMERMANN, 2000). Além disso, a presença de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos associados à partícula viral contribui para o aumento da sua imunogenicidade (GRABOWSKA *et al.*, 2000). O orquestramento desta resposta gerada pela vacinação com fagos é fundamental contra infecções por protozoários como *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, considerando que a proteção contra estas doenças está fortemente associada ao sucesso em montar uma resposta celular eficaz.

O esquema de vacinação em três doses gerou aumento progressivo e significativo dos níveis de IgG, que permaneceram estáveis 30 dias após a última imunização (Figura 18). Esta cinética é característica do processo de vacinação, em que a exposição inicial a um antígeno estimula uma resposta extrafolicular responsável pela produção de títulos mais baixos de anticorpo. Reexposições a este antígeno, através de novas doses da vacina, ativam células de memória e amplificam a resposta humoral observada inicialmente (SIEGRIST, 2018). Enquanto mimotopos altamente imunogênicos induzem uma resposta detectável após a primeira imunização, na maioria dos casos esquemas de imunização mais longos são necessários para obter um resultado satisfatório, de forma que alguns animais começam a exibir resposta imune somente após três ou quatro doses (GALFRÈ *et al.*, 1996). Portanto, a resposta observada está de acordo com o que é esperado ao utilizar vacinas compostas por mimotopos.

A imunização com o fago selvagem, por outro lado, induziu uma resposta humoral elevada logo após a primeira imunização, mantendo-se constante independente das doses adicionais (Figura 18). De fato, o estímulo de uma resposta robusta aos antígenos do fago selvagem é um evento comumente observado, caracterizado pela detecção precoce de títulos elevados de anticorpos (GALFRÈ *et al.*, 1996). Esta diferença nos padrões de resposta entre vacina e fago selvagem pode ser explicada não só pela imunogenicidade como também pela natureza ubíqua dos fagos. Ocorrendo naturalmente em diferentes animais, a presença de fagos já foi descrita no intestino, na cavidade oral, em amostras de fezes, saliva, escarro e soro humano (GÓRSKI; WEBER-DABROWSKA, 2005). Assim, indivíduos não imunizados

podem apresentar níveis baixos de anticorpos anti-fago que são prontamente amplificados após reexposição aos antígenos virais.

Desta forma, enquanto a vacina provocou o amadurecimento de uma resposta humoral direcionada aos peptídeos ancorados ao capsídeo viral, a imunização com o fago selvagem induziu uma resposta imune pré-montada, modulada pelas próprias proteínas do seu capsídeo e por LPS associado. De fato, a expansão de plasmócitos, em uma via independente de células T, pode ser detectada no sangue e no baço em apenas dois dias após a imunização com fagos de fenótipo selvagem, um processo que provavelmente está relacionado com o reconhecimento das proteínas VIII (HENRY *et al.*, 2011). Considerando a baixa complexidade do capsídeo, as proteínas que o compõe apresentam perfil imunodominante, gerando uma resposta humoral restrita aos 12 resíduos N-terminais de pVIII e aos domínios N1 e N2 de pIII (KNEISSEL *et al.*, 1999; VAN HOUTEN *et al.*, 2010). A remoção destes epitopos é, inclusive, uma estratégia utilizada para minimizar a imunogenicidade ao fago, tornando a resposta humoral mais específica e focada nas sequências peptídicas expressas de maneira recombinante (HENRY *et al.*, 2011; VAN HOUTEN *et al.*, 2010). Esta redução na imunogenicidade do fago provavelmente não altera sua capacidade de induzir uma resposta celular, uma vez que predições *in silico* apontam que as proteínas pVI e pVII são as principais responsáveis pela modulação de respostas T CD4⁺ em camundongos BALB/c (HENRY *et al.*, 2011).

Embora a imunização com a vacina e fago selvagem terem gerado níveis de anticorpos semelhantes após três doses, algumas diferenças foram observadas no perfil celular. Para analisar esta resposta foram escolhidos os principais marcadores de proteção para as leishmanioses e doença de Chagas, principalmente de proliferação das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e a produção de IFN- γ e IL-10 por estas células. Além disso, buscamos avaliar a proliferação de linfócitos B (CD19) e diferenciar as populações de memória através dos biomarcadores CD44, CD62L e CD27. Infelizmente não foi possível detectar as marcações com CD19 e CD62L no experimento realizado, de forma que as populações obtidas foram caracterizadas como células T auxiliares (CD4⁺) ou citotóxicas (CD8⁺), com perfil de memória (CD44⁺) e fenótipo efetor (CD27⁻).

Em infecções por *Leishmania* spp. e *T. cruzi* a qualidade da resposta imune gerada é crucial para a proteção contra estes parasitos. Uma vacina ideal deve, além

de provocar a proliferação de linfócitos do perfil Th1 e ativação de células citotóxicas, induzir memória imunológica de longo prazo (CAMARGO *et al.*, 2021; KUMAR; ENGWERDA, 2014). Em infecções que induzem imunidade esterilizante a identificação de células T de memória é relativamente simples, uma vez que as células que sobrevivem após a resolução da doença são, por definição, células de memória (KAECH; WHERRY, 2012). Por outro lado, as leishmanioses e a doença de Chagas são infecções que geram imunidade concomitante, isto é, mesmo após resolução clínica da doença há detecção de parasitos viáveis no organismo afetado (COURA, 2007; HOHMAN; PETERS, 2019; MANDELL; BEVERLEY, 2017). A persistência destes antígenos torna a caracterização da memória gerada por estas infecções um processo mais complexo, de maneira que muitos autores passaram a investigar se estas células poderiam de fato ser geradas nestas doenças (SCOTT, PHILLIP, 2020).

O modelo de imunidade concomitante melhor estudado é a infecção experimental por *L. major*. Nesta infecção há pelo menos duas populações circulantes de linfócitos T CD4⁺ específicos; células T efetoras que não sobrevivem na ausência de parasitos e células T de memória central de longo prazo (COLPITTS *et al.*, 2010; SCOTT, PHILLIP, 2005, 2020; ZAPH *et al.*, 2004). Estas células circulam pelos órgãos linfoides mesmo na ausência do patógeno, e são ativadas e diferenciam-se prontamente em células efetoras após infecção secundária (SCOTT, PHILLIP, 2020). O potencial protetor destas células foi demonstrado em experimentos de transferência adotiva, conferindo resistência a camundongos não-imunes a *L. major* (ZAPH *et al.*, 2004). A manutenção de células T de memória na ausência de parasitos também foi demonstrada na infecção por *T. cruzi*, em que camundongos permaneceram resistentes à reinfeção mesmo após a cura esterilizante induzida por tratamento (BUSTAMANTE; BIXBY; TARLETON, 2008). A geração de células de memória é, portanto, um fator fundamental para conferir proteção contra as leishmanioses e a doença de Chagas. Apesar desta população não estar bem caracterizada, apenas a vacina foi capaz de estimular a proliferação de células T CD4 de memória (Figura 20A).

O aumento da produção de IFN- γ pelas células auxiliares foi observado após imunização com o fago selvagem e a vacina (Figura 20B). No entanto, o fago selvagem induziu níveis mais elevados dessa citocina inflamatória. A presença de IFN- γ é crucial para a polarização da resposta Th1 assim como a ativação de

macrófagos, fatores chave para a resolução das infecções por *Leishmania* spp. e *T. cruzi* (IKEOGU *et al.*, 2020; PADILLA; BRANDAN; BASOMBRI, 2017). No entanto, embora seja importante para a resolução destas infecções, a produção exacerbada dessa citocina pode ocasionar em imunopatologia devido a inflamação desregulada. Este tipo de resposta induzida pela persistência de parasitos no tecido cardíaco está associado com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica (ABEL *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003; RIBEIRÃO *et al.*, 2000). Altos níveis de IFN- γ e TNF- α também estão presentes em pacientes com as formas cutânea e mucocutânea da leishmaniose. Nestes indivíduos, uma resposta Th1 exacerbada e a ausência de mecanismos regulatórios apropriados estão correlacionadas com dano tecidual e agravo da patologia (ANTONELLI *et al.*, 2005; BACELLAR *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2007)

O aumento da produção de IFN- γ por células T CD8 também foi observado após imunização com fago selvagem e vacina (Figura 21A). No entanto, a manutenção do aumento de IFN- γ em células T CD8⁺ com perfil de memória foi observado somente após a imunização com a vacina (Figura 21B). Isto é especialmente interessante para a modulação de uma resposta efetiva contra a doença de Chagas, uma vez que indivíduos com a doença crônica avançada apresentam níveis reduzidos de células de memória produtoras de IFN- γ comparados com indivíduos com nenhum ou poucos sintomas (LAUCELLA *et al.*, 2004). Estudos demonstram que linfócitos de memória que possuem alta capacidade de proliferação e marcadores de diferenciação precoce estão associados a um perfil de imunidade protetora tanto na doença de Chagas como na infecção experimental por *L. major* (ALBAREDA, CECILIA *et al.*, 2006; MULLER *et al.*, 1993; ZAPH *et al.*, 2004). Neste trabalho, análises adicionais serão necessárias para caracterizar o perfil de diferenciação das células de memória estimuladas exclusivamente pela vacinação.

A imunização com o fago selvagem e a vacina gerou aumento de linfócitos T CD27-CD4⁺ (Figura 20C) e CD27-CD8⁺ (Figura 21C), embora a vacina tenha estimulado maior proliferação da população CD27-CD4⁺ em comparação com o fago. CD27 pertence à família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) (CROFT, 2003), sendo expresso na maioria das células T CD4 e CD8 e tem sido utilizado para classificar as populações de células T de memória (HENDRIKS *et al.*, 2000; HIKONO *et al.*, 2007; WHERRY *et al.*, 2003). A perda deste marcador tem sido associada à

indução de um fenótipo efetor tanto em células T CD4 como CD8 (DE JONG *et al.*, 1992; HAMANN *et al.*, 1997). Células de memória CD27⁻ apresentam perfil mais diferenciado quando comparadas às células CD27⁺, maior produção de citocinas como IFN- γ , IL-4, IL-13 e IL-10 e resposta de recall mais potente (SCHIÖTT *et al.*, 2004).

Nos animais que receberam o fago e a vacina, as células CD27⁻CD8⁺ apresentaram produção de IL-10 reduzida (Figura 21D). Esta redução foi observada nas células CD27⁻CD4⁺ apenas nos animais vacinados (Figura 20C). Apesar de ser importante para a modulação da resposta imune e limitação de imunopatologia mediada por IFN- γ (HOHMAN; PETERS, 2019; SALVADOR *et al.*, 2020), a atividade regulatória promovida por IL-10 está associada à supressão de uma resposta celular Th1 específica nas infecções por *Leishmania* spp. e *T. cruzi* (GAUTAM *et al.*, 2011; KANE; MOSSER, 2001; PETERS; SACKS, 2006; REED, S G *et al.*, 1994; SILVA, S J *et al.*, 1992). Ademais, a produção de IL-10 parece limitar a geração de células Th1 multifuncionais após vacinação contra *L. major* (DARRAH *et al.*, 2010), de maneira que, neste trabalho, a redução de IL-10 observada após imunização com o fago e a vacina pode contribuir para a geração de uma resposta protetora mais eficiente.

A imunização com o fago e a vacina reduziu a carga parasitária no baço dos camundongos desafiados com *L. infantum* (Figura 22A). A carga de parasitos no fígado (Figura 22B) foi igualmente baixa nos três grupos, resultado que condiz com a cinética do parasito no órgão, considerando que espécies visceralizantes multiplicam-se rapidamente nas primeiras quatro semanas pós infecção e são eliminadas espontaneamente por volta da oitava semana (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Em relação aos animais desafiados por *L. amazonensis*, enquanto a avaliação por PCR em tempo real não revelou diferenças na carga parasitária entre os grupos (Figura 23B), a análise por diluição limitante demonstrou que o fago e a vacina foram capazes de reduzir o número de parasitos presentes na lesão (Figura 23A). Resultados distintos como estes podem ser explicados por características inerentes às metodologias utilizadas. Enquanto a técnica de diluição limitante compara o crescimento de parasitos viáveis presentes no tecido infectado, a PCR em tempo real é capaz de amplificar todo o material genético presente na amostra, independente da viabilidade do parasito (BRETAGNE *et al.*, 2001).

Apenas a vacina foi capaz de reduzir a parasitemia dos animais desafiados por *T. cruzi*, tanto no 8º dia pós infecção antecedendo ao pico de parasitemia, como após o 19º dia pós infecção (Figura 25). Ademais, não foi possível detectar parasitos circulantes nos animais vacinados a partir do 29º dia pós infecção, enquanto a parasitemia permaneceu constante nos animais controle e imunizados com fago selvagem até o 45º dia pós infecção. Este resultado obtido com a vacinação é bastante relevante, uma vez que, em pacientes chagásicos, a redução da fase parasitêmica através do uso de fármacos está associada à melhora clínica e menor incidência de morbidade na fase crônica (BERN *et al.*, 2007). Aliada à redução da parasitemia, a imunização com a vacina e com o fago preveniram a perda de peso associada à morbidade causada pela infecção (Figura 26). É esperado que a cepa Y de *T. cruzi* apresente maior tropismo pelo intestino, uma vez que pertence ao isolado TcII (ZINGALES *et al.*, 2012). Este perfil pode ser observado através do maior número de parasitos encontrados no intestino durante a fase crônica, quando comparado a quantidade de parasitos encontrada no tecido cardíaco. Apesar da vacina e o fago selvagem terem reduzido a carga parasitária no intestino (Figura 27A), houve uma diferença significativa no aumento da carga parasitária no coração apenas dos animais imunizados com fago selvagem (Figura 27B). Neste grupo parece ter havido uma mudança nos padrões de disseminação do parasito (COATES *et al.*, 2013), que pode ter ocorrido em decorrência da inflamação promovida pelo fago selvagem no intestino.

Apesar da vacina ter sido capaz de reduzir a carga parasitária de animais desafiados com *L. infantum*, *L. amazonensis* e *T. cruzi*, a imunização com apenas o fago selvagem apresentou resultados semelhantes. Este perfil provavelmente está relacionado com a promoção de um ambiente inflamatório decorrente da imunogenicidade intrínseca das proteínas do capsídeo e presença de motivos CpG bacterianos (HESS; JEWELL, 2019). O perfil de produção de IgG (Figura 18) e a expansão diferencial de células de memória (Figuras 20 e 21) são indicativos de que a vacina estimula uma resposta imune mais específica do que o fago selvagem. Apesar de bacteriófagos filamentosos serem considerados excelentes carreadores vacinais (AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2016), a resposta imune associada a estes organismos pode estar mascarando o verdadeiro potencial dos peptídeos componentes da vacina. Assim, estes candidatos deverão ser avaliados em outro

sistema de imunização que exclua o fago como elemento vacinal. Esta abordagem foi explorada por Chávez-Fumagalli (2008) e Toledo-Machado *et al.* (2015), que utilizaram as mesmas bibliotecas deste trabalho para selecionar candidatos vacinais.

Após selecionar dois candidatos (11H e 12A) a partir de *phage display* e da técnica de SPOT-síntese, Chávez-Fumagalli (2008) utilizou os peptídeos na forma solúvel com o adjuvante de Freund para imunização contra *L. amazonensis*. A imunização foi capaz de reduzir a carga parasitária e o tamanho médio da lesão de maneira significativa, além de estimular elevada produção de IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10. Toledo-Machado *et al.* (2015) utilizaram uma metodologia semelhante ao obter seu candidato vacinal (Peptide 5), o qual foi formulado com hidróxido de alumínio e encapsulado em sistema lipossomal. A imunização reduziu a carga parasitária em até 98% em camundongos desafiados por *L. infantum*. Estes autores demonstraram a possibilidade de selecionar bons candidatos a partir das mesmas bibliotecas de fagos utilizadas neste trabalho, mesmo em sistemas em que o fago não está presente como carreador.

Vacinas compostas por peptídeos expressos em fagos filamentosos, como a avaliada aqui, também se mostraram eficazes na redução de carga parasitária em infecções por *Leishmania* spp. Esta abordagem foi utilizada em trabalhos pontuais publicados por Costa *et al.* (2014, 2015), Ramos *et al.* (2017) e Carvalho *et al.* (2018). Todos estes autores selecionaram clones de fagos a partir da biblioteca comercial Ph.D.-C7C (New England BioLabs, EUA), através da sua afinidade por anticorpos presentes no soro de humanos ou cães naturalmente infectados. O inóculo vacinal utilizado variou entre autores de 10^{10} a 10^{12} TU, até certo nível semelhante ao utilizado neste trabalho. Enquanto Costa *et al.* (2014) associaram os clones selecionados e o fago selvagem à saponina, os demais trabalhos demonstraram a eficácia vacinal de seus candidatos na ausência de adjuvante. De maneira geral, as vacinas compostas por clones selecionados de maneira específica para *Leishmania* spp. foram capazes de reduzir a carga parasitária após desafio, promovendo um perfil de resposta Th1. A imunização com o fago selvagem não apresentou redução de carga parasitária significativa em nenhum desses trabalhos, induzindo perfil imune semelhante ao exibido pelos animais de grupos controle que receberam solução salina. Apesar dos fagos filamentosos compartilharem grande semelhança genética, o vetor f88-4 utilizado neste trabalho é derivado do fago filamentosso fd-tet e apresenta sistema 88

(SIDHU; GEYER, 2015), enquanto a biblioteca comercial Ph.D.-C7C é construída a partir do fago M13 e expressa peptídeos aleatórios de 7 aminoácidos fusionados à proteína pIII (ALVES *et al.*, 2014). Possivelmente variações estruturais entre os dois tipos de bacteriófagos selvagens são responsáveis pelas diferenças observadas após o esquema de imunização neste e nos demais trabalhos.

A análise histopatológica revelou que a imunização com o fago e a vacina estimularam, no baço, a proliferação de regiões B e T dependentes e ativação do centro germinativo, processos fundamentais para a maturação da resposta imune celular e humoral específica observada nestes animais (Figura 28C-F). Além disso, através desta análise foi possível averiguar a segurança vacinal dos imunizantes utilizados, uma vez que não houve alteração patológica em nenhum dos outros tecidos avaliados, que mantiveram aspectos morfológicos normais (Figura 28C-F; Figura 29B-C; Figura 31C-F; Figura 32 B-C; Figura 34C-F). De modo geral, os animais imunizados e desafiados pertencentes aos grupos PBS e fago selvagem exibiram alterações patológicas no baço mais evidentes e infiltrado inflamatório mais intenso do que os animais vacinados (Figura 28G-L). A deposição de hemossiderina no citoplasma de macrófagos dos grupos PBS e fago selvagem é indicativo de lesão tecidual associada à áreas de hemorragia (SUTTIE, 2006), um evento comumente descrito na infecção por *Leishmania* spp. (PEREIRA *et al.*, 2009; TAFURI *et al.*, 2001; YOUSSEFI *et al.*, 2019) e que não foi observado nos animais vacinados. O aumento da inflamação hepática nos grupos PBS e fago selvagem foi observada através da congestão dos capilares sinusoides e do maior número de células de Kupffer hiperplásicas, alterações hepáticas presentes com frequência na infecção por *Leishmania* spp (GIUNCHETTI *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2019; MORENO, A. *et al.*, 1988). Estas alterações foram ausentes ou estiveram presentes em menor grau nos animais vacinados, indicando o potencial da vacina em reduzir a patologia associada à infecção (Figura 29D-F). Apesar dos achados histopatológicos do coxim plantar serem semelhantes entre os grupos avaliados, a vacina restringiu o desenvolvimento da lesão à epiderme, além de estimular maior proliferação de feixes fibrosos conjuntivos, sugestivo de remodelamento tecidual (Figura G-L).

O quadro de cardiopatia chagásica crônica inclui diversos dos achados observados, como miocardite difusa, hipertrofia dos cardiomiócitos e início de fibrose miocárdica (TALVANI; TEIXEIRA, 2011). A produção exacerbada de citocinas

inflamatórias aliada a mecanismos regulatórios deficientes estão relacionados com a progressão da doença cardíaca crônica (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; GOMES *et al.*, 2003). A intensidade desta inflamação no miocárdio, entretanto, não está relacionada ao número de parasitos presentes no tecido (DE SOUZA-BASQUEIRA *et al.*, 2020), o que pode ser observado pela diferença de carga parasitária obtida entre os grupos (Figura 27B). Enquanto o mesmo padrão inflamatório foi observado no tecido cardíaco de todos os animais imunizados e desafiados por *T. cruzi* (Figura 33A), nos animais do grupo PBS e fago selvagem foi detectado um maior número de cardiomiócitos degenerados e em autólise em comparação aos animais vacinados (Figura 33B). No intestino observou-se o aumento de infiltrado inflamatório nos animais imunizados com fago selvagem e vacina em comparação com o grupo controle, o que possivelmente está associado à redução da carga parasitária neste órgão (Figura 27A). Todavia, o espessamento da camada muscular do intestino associada ao desenvolvimento de ganglionite foi observado apenas nos animais do grupo PBS e fago selvagem, indicando alteração da mobilidade intestinal (JABARI *et al.*, 2014).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das imunizações com a vacina e o fago selvagem terem reduzido os níveis de carga parasitária de maneira semelhante, a vacina demonstrou melhor performance como imunizante uma vez que alcançou os mesmos resultados aliados à uma maior preservação morfológica de todos os órgãos analisados. Além disso, a vacina induziu uma resposta celular de memória mais robusta do que o fago selvagem. A técnica de *phage display* foi capaz de selecionar sequências peptídicas promissoras, o que foi verificado através de ensaios pré e pós vacinais. Devido à imunogenicidade intrínseca dos componentes estruturais do fago selvagem, uma abordagem alternativa se faz necessária a fim de avaliar os efeitos vacinais dos peptídeos selecionados na ausência deste carreador. As perspectivas futuras deste trabalho incluem a avaliação de uma vacina viva composta por estes peptídeos, além da aplicação destas sequências em outros métodos vacinais. Parte deste objetivo foi concluído durante o período de doutorado sanduíche realizado na *Ohio State University*, através da clonagem das sequências candidatas no genoma da cepa atenuada de *Leishmania major* deficiente para o gene da centrina (*LmCEN*^{-/-}). Além de otimizar a imunogenicidade e proteção conferida por estes peptídeos, o uso de uma vacina viva como carreadora de sequências vacinais exógenas poderá permitir a combinação de outros genes não relacionados, visando vacinas mais complexas contra diversas etiologias.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L C J *et al.* Chronic Chagas ' Disease Cardiomyopathy Patients Display an Increased IFN- Response to Trypanosoma cruzi Infection. *Journal of Autoimmunity*, v. 17, p. 99–108, 2001.

AGHEBATI-MALEKI, Leili *et al.* Phage display as a promising approach for vaccine development. *Journal of Biomedical Science*, v. 23, n. 1, p. 1–18, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12929-016-0285-9>>.

AHLUWALIA, S. *et al.* Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America. *BMJ*, v. 329, p. 842–844, 2004.

AKHOUNDI, Mohammad *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.

ALBAREDA, Cecilia *et al.* Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8 1 T cells in chronic Chagas ' disease patients. *International Immunology*, v. 18, n. 3, p. 465–471, 2006.

ALBAREDA, M Cecilia *et al.* Perturbed T Cell IL-7 Receptor Signaling in Chronic Chagas Disease. *The Journal of Immunology*, v. 194, p. 3883–3889, 2015.

ALMEIDA, Roque P. *et al.* Biological behavior of Leishmania amazonensis isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 54, n. 2, p. 178–184, 1996.

ALVES, Patrícia Terra *et al.* Revisiting the CD14: epitope mapping by Phage Display. *Immunobiology*, v. 219, n. 11, p. 822–829, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.07.002>>.

ANDERSON, Charles F *et al.* CD4+CD25–Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *JEM*, v. 204, n. 2, p. 285–297, 2007.

ANDERSON, Charles F; MENDEZ, Susana; SACKS, David L. Nonhealing Infection despite Th1 Polarization Produced by a Strain of Leishmania major in C57BL/6 Mice. *The Journal of Immunology*, v. 174, p. 2934–2941, 2005.

ANTONELLI, Lis R V *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology Letters*, v. 101, p. 226–230, 2005.

ARAP, Marco Antonio. Phage display technology - Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2005.

ARMIJOS, R X *et al.* Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved Leishmania amazonensis vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, v. 22, p. 1320–1326, 2004.

ASSREUY, Jamil *et al.* Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and

killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology*, v. 24, n. 3, p. 672–676, 1994.

BACELLAR, Olívia *et al.* Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.

BAIOCCO, Paola *et al.* Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, n. 8, p. 2603–2612, 2009.

BAKSHINEJAD, Babak; SADEGHIZADEH, Majid. Bacteriophages and their applications in the diagnosis and treatment of hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 33, p. 11671–11683, 2014.

BANERJEE, Antara *et al.* Live Attenuated *Leishmania donovani* Centrin Gene–Deleted Parasites Induce IL-23–Dependent IL-17–Protective Immune Response against Visceral Leishmaniasis in a Murine Model. *The Journal of Immunology*, v. 200, n. 1, p. 163–176, 2018.

BASILE, L. *et al.* Chagas disease in European countries : the challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance*, v. 16, n. 37, 2011.

BASOMBRÍO, Miguel A *et al.* Targeted Deletion Of The Gp72 Gene Decreases The Infectivity Of *Trypanosoma Cruzi* For Mice And Insect Vectors Targeted Deletion Of The Gp72 Gene Decreases The Infectivity Of *Trypanosoma Cruzi* For Mice And Insect Vectors. *Journal of Parasitology*, v. 88, n. 3, p. 489–493, 2002.

BAZAN, Justyna; CAŁKOSIŃSKI, Ireneusz; GAMIAN, Andrzej. Phage display — A powerful technique for immunotherapy 2. Vaccine delivery. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 8, n. 12, p. 1829–1835, 2012.

BEAUMIER, Coreen M *et al.* Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine*, v. 34, p. 2996–3000, 2016.

BERN, C. Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, p. 52–54, 2009.

BERN, C *et al.* Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States: A Systematic Review. *JAMA*, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.

BHATTACHARYA, Parna *et al.* Genetically Modified Live Attenuated *Leishmania donovani* Parasites Induce Innate Immunity through Classical Activation of Macrophages That Direct the Th1 Response in Mice. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 10, p. 3800–3815, 2015.

BHATTACHARYA, Parna *et al.* Live Attenuated *Leishmania donovani* Centrin Knock Out Parasites Generate Non-inferior Protective Immune Response in Aged Mice against Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 8, p. 1–28, 2016.

BHAUMIK, Siddhartha Kumar *et al.* UDP-Gal: N-acetylglucosamine β 1–4 galactosyltransferase expressing live attenuated parasites as vaccine for visceral leishmaniasis. *Glycoconjugate Journal*, v. 26, n. 6, p. 663–673, 2009.

BIRNBAUM, Ron; CRAFT, Noah. Innate immunity and leishmania vaccination strategies. *Dermatologic Clinics*, v. 29, n. 1, p. 89–102, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2010.08.014>>.

BIVONA, Augusto E. *et al.* Chagas disease vaccine design: the search for an efficient *Trypanosoma cruzi* immune-mediated control. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 5, p. 165658 Contents, 2020.

BOARI, Jimena Tosello *et al.* IL-17RA-Signaling Modulates CD8 + T Cell Survival and Exhaustion During *Trypanosoma cruzi* Infection. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1–18, 2018.

BONNYCASTLE, L. L.C. *et al.* Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *Journal of Molecular Biology*, v. 258, n. 5, p. 747–762, 1996.

BOOTH, Mark. Climate Change and the Neglected Tropical Diseases. *Advances in Parasitology*. [S.l: s.n.], 2018. p. 39–126.

BORJA-CABRERA, G P *et al.* Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, v. 26, p. 4991–4997, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. [S.l: s.n.], 2014.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 1973, 1973.

BRETAGNE, Stéphane *et al.* Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in Infected Mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, n. 4, p. 828–831, 2001.

BRYAN, Marianne A; GUYACH, Siobhan E; NORRIS, Karen A. Specific Humoral Immunity versus Polyclonal B Cell Activation in *Trypanosoma cruzi* Infection of Susceptible and Resistant Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 7, p. e733, 2010.

BUSTAMANTE, Juan M; BIXBY, Lisa M; TARLETON, Rick L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nature Medicine*, v. 14, n. 5, p. 542–550, 2008.

CAMARGO, Erney Plessmann *et al.* Why do we still have not a vaccine against Chagas disease? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 116, n. 5, p. 1–8, 2021.

CARCELÉN, J. *et al.* The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the

absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*, v. 27, p. 5964–5973, 2009.

CARDILLO, Fabíola *et al.* Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Pathogens and Disease*, v. 73, p. 1–8, 2015.

CARLSEN, E. D. *et al.* Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 182, n. 2, p. 109–118, 2015.

CARVALHO *et al.* Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunology*, v. 29, p. 251–258, 2007.

CARVALHO, Gersa B *et al.* High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis patients and their use as vaccine candidates against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*, p. 1–11, 2018.

CHAKRAVARTY, Jaya *et al.* A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1 + MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 29, n. 19, p. 3531–3537, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.096>>.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel Angel. *Proteção contra a infecção por Leishmania (Leishmania) amazonensis pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por phage display e spot synthesis*. 2008. 2008.

COATES, Bria M *et al.* Endothelial Transmigration by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. e81187, 2013.

COLER, Rhea N *et al.* From mouse to man: safety , immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. *Clinical & Translational Immunology*, v. 4, n. 4, p. e35-13, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cti.2015.6>>.

COLPITTS, Sara L *et al.* The Early Generation of a Heterogeneous CD4 + T Cell Response to *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, v. 185, p. 2416–2423, 2010.

COSTA *et al.* Mimotope-based vaccines of leishmania infantum antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 2014.

COSTA, Carlos Henrique Nery *et al.* Vaccines for the leishmaniases: Proposals for a research Agenda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 3, p. 1–9, 2011.

COSTA, LOURENA EMANUELE *et al.* Phage-fused epitopes from *Leishmania infantum* used as immunogenic vaccines confer partial protection against *Leishmania amazonensis* infection . *Parasitology*, v. 142, n. 10, p. 1335–1347, 2015.

COTRINA, Javier Fernández *et al.* A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend against canine leishmaniosis. *Vaccine*, v. 36, p. 1972–1982, 2018.

COURA, José Rodrigues. Chagas disease : what is known and what is needed – A background

article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 113–122, 2007.

CRISTÓVÃO-SILVA, Ana Catarina *et al.* Chagas Disease Treatment and Rational Drug Discovery: A Challenge That Remains. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, n. August, p. 1–6, 2019.

CROFT, Michael. Co-stimulatory members of the TNFR family: Keys to effective T-cell immunity? *Nature Reviews Immunology*, v. 3, n. 8, p. 609–620, 2003.

DA SILVA, Valdemir O *et al.* A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, v. 19, p. 1082–1092, 2001.

DANESHVAR, Hamid *et al.* Gentamicin-Attenuated *Leishmania infantum* Vaccine : Protection of Dogs against Canine Visceral Leishmaniasis in Endemic Area of Southeast of Iran. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 4, p. 2–8, 2014.

DANTAS-TORRES, Filipe *et al.* Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. *Emerging Infectious Diseases*, v. 25, n. 12, p. 5–8, 2019.

DARRAH, Patricia A. *et al.* IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. *Journal of Experimental Medicine*, v. 207, n. 7, p. 1421–1433, 2010.

DATTA, Sanchita *et al.* Experimental Parasitology Radio-attenuated leishmanial parasites as immunoprophylactic agent against experimental murine visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v. 130, n. 1, p. 39–47, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.10.001>>.

DAVID, Consuelo V; CRAFT, Noah. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, v. 22, p. 491–502, 2009.

DE ALENCAR, Bruna C G *et al.* Perforin and Gamma Interferon Expression Are Required for CD4+ and CD8+ T-Cell-Dependent Protective Immunity against a Human Parasite , *Trypanosoma cruzi* , Elicited by Heterologous Plasmid DNA Prime-Recombinant Adenovirus 5 Boost Vaccination. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 10, p. 4383–4395, 2009.

DE JONG, Rolien *et al.* The CD27– subset of peripheral blood memory CD4+ lymphocytes contains functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo. *European Journal of Immunology*, v. 22, n. 4, p. 993–999, 1992.

DE LA CRUZ, Vidal F; LAL, Altaf A; MCCUTCHAN, Thomas F. Immunogenicity and Epitope Mapping of Foreign Sequences via Genetically Engineered Filamentous Phage *. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 9, p. 4318–4322, 1988.

DE OLIVEIRA, Ricardo Brandt *et al.* Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *American Journal of Gastroenterology*, v. 93, n. 6, p. 884–889, 1998.

DE SOUZA-BASQUEIRA, Marcela *et al.* Gut Dysbiosis in Chagas Disease. A Possible Link to

the Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, n. August, p. 1–8, 2020.

DERDA, Ratmir *et al.* Diversity of Phage-Displayed Libraries of Peptides during Panning and Amplification. *Molecules*, v. 16, p. 1776–1803, 2011.

DEY, Ranadhir *et al.* Characterization of Cross-Protection by Genetically Modified Live-Attenuated *Leishmania donovani* Parasites against *Leishmania mexicana*. *The Journal of Immunology*, v. 193, n. 7, p. 3513–3527, 2014.

DIAS, Ana Carolina Soares. *Validação de Peptídeos Miméticos Recombinantes como Ferramenta Diagnóstica e Vacinal para Leishmaniose Humana*. 2016. 2016.

DUARTE, Mariana Costa *et al.* Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 4, p. 398–407, 2016.

DUMONTEIL, Eric. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, p. 1075–1082, 2009.

DUNNING, Naomi. *Leishmania* vaccines : from leishmanization to the era of DNA technology. *BioscienceHorizons*, v. 2, n. 1, p. 73–83, 2009.

DUSCHAK, Vilma G; COUTO, Alicia S. Cruzipain, the Major Cysteine Protease of *Trypanosoma cruzi*: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target. A Review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 3174–3202, 2009.

DUTHIE, Malcolm S *et al.* The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine*, v. 30, n. 2, p. 134–141, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.005>>.

DUTRA, Walderez O.; ROCHA, Manoel Otávio C.; TEIXEIRA, Mauro M. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 12, p. 581–587, 2005.

EBRAHIMIZADEH, Walead; RAJABIBAZL, Masoumeh. Bacteriophage Vehicles for Phage Display: Biology, Mechanism, and Application. *Current Microbiology*, v. 69, n. 2, p. 109–120, 2014.

EICHENBERGER, Anna *et al.* A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure. *BMC Infectious Diseases*, p. 1–5, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-017-2192-4>>.

FERDOUS, Saba *et al.* B-cell epitopes: Discontinuity and conformational analysis. *Molecular Immunology*, v. 114, p. 643–650, 2019.

FERNANDES, M.C.; ANDREWS, N.W. Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy that Promotes Persistence. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 3, p. 734–747, 2013.

FIUZA, Jacqueline Araújo *et al.* Induction of immunogenicity by live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites in dogs. *Vaccine*, v. 31, n. 14, p. 1785–1792, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.048>>.

FIUZA, Jacqueline Araújo *et al.* Intradermal Immunization of *Leishmania donovani* Centrin Knock-Out Parasites in Combination with Salivary Protein LJM19 from Sand Fly Vector Induces a Durable Protective Immune Response in Hamsters. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2016.

FIUZA, Jacqueline Araújo *et al.* Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. *Vaccine*, v. 33, n. 2, p. 280–288, 2015.

FRANCO-PAREDES, Carlos *et al.* Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. *BMC International Health and Human Rights*, v. 7, n. 7, 2007.

FRANK, Ronald. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, v. 48, n. 42, p. 9217–9232, 1992.

FRANK, Ronald. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *Journal of Immunological Methods*, v. 267, n. 1, p. 13–26, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135797>>.

FREITAS-JUNIOR, Lucio H. *et al.* Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 2, p. 11–19, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>>.

FUJIWARA, Ricardo Toshio *et al.* Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research*, v. 36, n. 5–6, p. 713–722, 2005.

GABRIEL, Áurea *et al.* Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. *Journal of Immunology Research*, v. 2019, 2019.

GALFRÈ, G *et al.* Immunization with Phage-Displayed Mimotopes. *Methods in Enzymology*. [S.l.: s.n.], 1996. v. 267. p. 109–115.

GARG, Nisha; BHATIA, Vandana. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert Review of Vaccines*, v. 4, n. 6, p. 867–880, 2005.

GAUBIN, Muriel *et al.* Processing of Filamentous Bacteriophage Virions in Antigen- Presenting Cells Targets Both HLA Class I and Class II Peptide Loading Compartments. *DNA and Cell Biology*, v. 22, n. 1, p. 11–18, 2003.

GAUTAM, Shalini *et al.* IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 2011.

GEYSEN, H M; RODDA, S J; MASON, T J. A Priori Delineation of a Peptide Which Mimics a

Discontinuous Antigenic Determinant. *Molecular Immunology*, v. 23, n. 7, p. 709–715, 1986.

GHORBANI, Masoud; FARHOUDI, Ramin. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug Design, Development and Therapy*, v. 12, p. 25–40, 2018.

GHOSH, Anirban; ZHANG, Wen Wei; MATLASHEWSKI, Greg. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1 / Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine*, v. 20, p. 59–66, 2002.

GILLESPIE, Portia M. *et al.* Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, v. 34, n. 26, p. 2996–3000, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16300718>>.

GIUNCHETTI, Rodolfo Cordeiro *et al.* Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, v. 84, n. 2, p. 269–277, 2008.

GOMES, J A S *et al.* Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas ' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003.

GONÇALVES, C. S. *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites & Vectors*, v. 11, n. 83, p. 1–14, 2018.

GÓRSKI, Andrzej; WEBER-DABROWSKA, Beata. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, n. 5, p. 511–519, 2005.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, EPIDEMIOLOGIA, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

GRABOWSKA, A. M. *et al.* Immunisation with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2. *Virology*, v. 269, n. 1, p. 47–53, 2000.

GRADONI, L. A Brief Introduction to Leishmaniasis Epidemiology. *The leishmaniases: old neglected tropical diseases*. [S.l: s.n.], 2018. p. 1–13.

GREENWOOD, Judith; WILLIS, Anne E.; PERHAM, Richard N. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *Journal of Molecular Biology*, v. 220, n. 4, p. 821–827, 1991.

GRIMALDI, Gabriel *et al.* Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. *PLoS ONE*, v. 12, n. 9, p. 1–18, 2017.

GUIÑAZÚ, Natalia *et al.* Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is

differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. *Microbes and Infection*, v. 6, p. 1250–1258, 2004.

GUPTA, Shivali; GARG, Nisha J. A Two-Component DNA-Prime/Protein-Boost Vaccination Strategy for Eliciting Long-Term, Protective T Cell Immunity against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 5, p. 1–24, 2015.

GUREVITZ, Juan M *et al.* Intensified Surveillance and Insecticide-based Control of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 4, 2013.

HAILU, Asrat *et al.* Geographical Variation in the Response of Visceral Leishmaniasis to Paromomycin in East Africa: A Multicentre, Open-Label, Randomized Trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 10, p. e709, 2010.

HAMANN, D *et al.* Phenotypical and functional separation of memory and effector human CD8pos T cells. *Immunology Letters*, v. 56, n. 1–3, p. 198, 1997.

HAMZEH-MIVEHROUD, Maryam *et al.* Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 23–24, p. 1144–1157, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.09.001>>.

HEEG, Klaus; ZIMMERMANN, Stefan. CpG DNA as a Th1 trigger. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 121, n. 2, p. 87–97, 2000.

HENDRIKS, Jenny *et al.* CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nature Immunology*, v. 1, n. 5, p. 433–440, 2000.

HENRY, Kevin A. *et al.* Developing strategies to enhance and focus humoral immune responses using filamentous phage as a model antigen. *Bioengineered Bugs*, v. 2, n. 5, p. 275–283, 2011.

HESS, Krystina L.; JEWELL, Christopher M. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioengineering and Translational Medicine*, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2019.

HIKONO, Hirokazu *et al.* Activation phenotype, rather than central-or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 204, n. 7, p. 1625–1636, 2007.

HOFSTRAAT, Karlijn; VAN BRAKEL, Wim H. Social stigma towards neglected tropical diseases: A systematic review. *International Health*, v. 8, n. Suppl 1, p. i53–i70, 2016.

HOFT, Daniel F *et al.* Trans-Sialidase Recombinant Protein Mixed with CpG Motif-Containing Oligodeoxynucleotide Induces Protective Mucosal and Systemic *Trypanosoma cruzi* Immunity Involving CD8 + CTL and B Cell-Mediated Cross-Priming. *The Journal of Immunology*, v. 179, p. 6889–6900, 2007.

HOHMAN, Leah S; PETERS, Nathan C. CD4 + T Cell-Mediated Immunity against the Phagosomal Pathogen *Leishmania* : Implications for Vaccination. *Trends in Parasitology*, v. 35, n. 6, p.

423–435, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.002>>.

IHME, Institute for Health Metrics and Evaluation. *GBD Results Tool*. Disponível em: <<http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>>. Acesso em: 1 jun. 2021.

IKEOGU, Nnamdi M *et al.* Leishmania Immunity : Advancing Immunotherapy and Vaccine Development. *Microorganisms*, v. 8, n. 1201, p. 1–21, 2020.

ISMAIL, Nevien *et al.* Immunization with live attenuated *Leishmania donovani* centrin-/- parasites is efficacious in asymptomatic infection. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. DEC, 2017.

JABARI, Samir *et al.* Chagasic megacolon: Enteric neurons and related structures. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 142, n. 3, p. 235–244, 2014.

JACKSON, Yves *et al.* Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 10, p. 6–12, 2010.

JACKSON, Yves; WYSSA, Baptiste; CHAPPUIS, François. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 75, p. 690–696, 2020.

JAIN, Keerti; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *Journal of Immunological Methods*, v. 422, p. 1–12, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2015.03.017>>.

JANEWAY, C A *et al.* B-cell activation by armed helper T cells. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*. [S.l.: s.n.], 2001. .

JOSHI, Sumit *et al.* Visceral leishmaniasis: Advancements in vaccine development via classical and molecular approaches. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. AUG, p. 1–18, 2014.

JUNQUEIRA, Caroline *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 12, n. 29, p. 1–23, 2010.

JUSTI, S. A.; GALVÃO, C. The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. *Trends in Parasitology*, v. 33, n. 1, p. 42–52, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.002>>.

KAECH, S M; WHERRY, E J. Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection. *Immunity*, v. 27, n. 3, p. 393–405, 2012.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes ? *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 9, 2006.

KANE, Margaret Mentink; MOSSER, David M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 2001.

KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasite & Vectors*, v. 10, n. 1,

p. 1–17, 2017.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>>.

KHAMESIPOUR, Ali *et al.* Leishmanization: Use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*, v. 23, n. 28, p. 3642–3648, 2005.

KHAMESIPOUR, Ali. Therapeutic vaccines for leishmaniasis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 14, n. 11, p. 1641–1649, 2014.

KHUSAL, Ketna Guilhermino *et al.* Prokineticin receptor identified by phage display is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* into mammalian cells. *Parasitology Research*, v. 114, n. 1, p. 155–65, 2014.

KNEISSEL, Sandra *et al.* Epitope structures recognised by antibodies against the major coat protein (g8p) of filamentous bacteriophage fd (Inoviridae). *Journal of Molecular Biology*, v. 288, n. 1, p. 21–28, 1999.

KUMAR, Rajiv; ENGWERDA, Christian. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*, v. 3, n. 3, p. e13, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cti.2014.4>>.

KUZMICHEVA, G A *et al.* Diversity and censoring of landscape phage libraries. *Protein Engineering, Design & Selection*, v. 22, n. 1, p. 9–18, 2009.

LAUCELLA, Susana A *et al.* Frequency of Interferon- γ - Producing T Cells Specific for *Trypanosoma cruzi* Inversely Correlates with Disease Severity in Chronic Human Chagas Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 189, p. 909–918, 2004.

LAUNOIS, Pascal *et al.* In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4 + T cells which are NK1 .1-. *European Journal of Immunology*, v. 25, p. 3298–3307, 1995.

LEE, Yun Kyung *et al.* Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Current Opinion in Immunology*, v. 21, p. 274–280, 2009.

LIEW, F Y; LI, Y; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. *Immunology*, v. 71, p. 556–559, 1990.

LIMA, Isadora S. *et al.* Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasites and Vectors*, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3723-1>>.

LIU, Margaret A; WAHREN, Britta; HEDESTAM, Gunilla B Karlsson. DNA Vaccines : Recent Developments and Future Possibilities. *Human Gene Therapy*, v. 17, p. 1051–1061, 2006.

LLANOS-CUENTAS, Alejandro *et al.* A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with sodium stibogluconate for the treatment of mucosal leishmaniasis. *Vaccine*, v. 28, n. 46, p. 7427–7435, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.092>>.

LOSADA, Irene *et al.* Benznidazole for the treatment of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 19, n. 5, p. 547–556, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1834849>>.

LUKEŠ, Julius *et al.* Translational initiation in *Leishmania tarentolae* and *Phytomonas serpens* (Kinetoplastida) is strongly influenced by pre-ATG triplet and its 5' sequence context. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 148, n. 2, p. 125–132, 2006.

LUQUE-ORTEGA, J R; RIVAS, L. Miltefosine (Hexadecylphosphocholine) Inhibits Cytochrome c Oxidase in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 4, p. 1327–1332, 2007.

MANDELL, Michael A; BEVERLEY, Stephen M. Continual renewal and replication of persistent *Leishmania major* parasites in concomitantly immune hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 5, p. E801–E810, 2017.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Suspensão da licenc_a de fabricação e comercialização do produto Leishmune. Nota Técnica nº_038/2014/DFIP/SDA.*

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 27, p. 123–147, 2013.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio *et al.* The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 6, p. 1–24, 2018.

MASON, Kathryn A *et al.* Targeting Toll-like Receptor 9 with CpG Oligodeoxynucleotides Enhances Tumor Response to Fractionated Radiotherapy. *Clinical Cancer Research*, v. 11, p. 361–369, 2005.

MATEUS, Jose *et al.* An Animal Model of Acute and Chronic Chagas Disease With the Reticulotropic Y Strain of *Trypanosoma cruzi* That Depicts the Multifunctionality and Dysfunctionality of T Cells. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1–17, 2019.

MATOCHKO, Wadim L *et al.* Prospective identification of parasitic sequences in phage display screens. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 3, p. 1784–1798, 2014.

MAYRINK, W *et al.* A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 4, p. 385–387, 1979.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *QJM*, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MEOLA, A *et al.* Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *The Journal of Immunology*, v. 154, p. 3162–3172, 1995.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963.

MILLS, Roger M. Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. *The American Journal of Medicine*, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.022>>.

MOAFI, Mohammad *et al.* Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. *International Journal of Preventive Medicine*, v. 10, p. 1–9, 2019.

MOLYNEUX, David H.; SAVIOLI, Lorenzo; ENGELS, Dirk. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *The Lancet*, v. 389, n. 10066, p. 312–325, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30171-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30171-4)>.

MONCAYO, Alvaro. Chagas Disease : Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 5, p. 577–591, 2003.

MORAES NETO, Roberval Nascimento *et al.* Asteraceae Plants as Sources of Compounds Against Leishmaniasis and Chagas Disease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, p. 1–20, 2019.

MORENO, A. *et al.* Hepatic fibrin-ring granulomas in visceral leishmaniasis. *Gastroenterology*, v. 95, n. 4, p. 1123–1126, 1988.

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

MORILLO, C A *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

MORIZOT, Gloria *et al.* Antimony to Cure Visceral Leishmaniasis Unresponsive to Liposomal Amphotericin B. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, p. 2–8, 2016.

MULLER, Ingrid *et al.* Gamma Interferon Response in Secondary Leishmania major Infection: Role of CD8+ T Cells. *Infection and Immunity*, v. 61, n. 9, p. 3730–3738, 1993.

MUTISO, Joshua Muli *et al.* Development of Leishmania vaccines: predicting the future from past and present experience. *Journal of Biomedical Research*, v. 27, n. 2, p. 85–102, 2013. Disponível em: <http://www.jbr-pub.org.cn/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=JBR130203&flag=1>.

NAGAJYOTHI, Fnu *et al.* Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease. *Cell Microbiology*, v. 14, n. 5, p. 634–643, 2012.

NAGILL, Rajeev; KAUR, Sukhbir. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. *International*

Immunopharmacology, v. 11, n. 10, p. 1464–1488, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.008>>.

NCT00982774. *Safety and Immunogenicity of the LEISH-F2 + MPL-SE Vaccine With SSG for Patients With PKDL*. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00982774>>.

NCT01011309. *A Study of the Efficacy and Safety of the LEISH-F2 + MPL-SE Vaccine for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis*. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011309>>.

NCT01751048. *LEISH-F3 + GLA-SE and the LEISH-F3 + MPL-SE Vaccine*. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01751048>>.

NIBORSKI, Leticia L *et al.* Recombinant antibody against *Trypanosoma cruzi* from patients with chronic Chagas heart disease recognizes mammalian nervous system. *EbioMedicine*, v. 63, p. 103206, 2021.

NOAZIN, Sassan *et al.* Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of leishmaniasis-A meta-analysis. *Vaccine*, v. 27, n. 35, p. 4747–4753, 2009.

NUNES, Maria Carmo Pereira *et al.* Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 62, n. 9, p. 767–776, 2013.

NUSSBAUM, K. *et al.* Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 15, p. 1594–1617, 2010.

OLIVA, Gaetano *et al.* A Randomised , Double-Blind , Controlled Efficacy Trial of " ve Dogs Exposed to Two the LiESP / QA-21 Vaccine in Nai *Leishmania infantum* Transmission Seasons. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 10, 2014.

OSMAN, Mohamed *et al.* A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 5, p. 1–24, 2017.

PADILLA, A M; BRANDAN, C P; BASOMBRIIO, M A. Vaccine development for Chagas disease. *American Trypanosomiasis Chagas Disease 2017*. [S.l: s.n.], 2017. p. 773–796.

PANDE, Jyoti; SZEWCZYK, Magdalena M.; GROVER, Ashok K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 6, p. 849–858, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>>.

PAPADOPOULOU, Barbara *et al.* Reduced Infectivity of a *Leishmania donovani* Bioprotein Transporter Genetic Mutant and Its Use as an Attenuated Strain for Vaccination. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 1, p. 62–68, 2002.

PARIS, Caroline *et al.* Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, n. 3, 2004.

PARK, Audrey Y *et al.* The Role of IL-12 in Maintaining Resistance to *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, v. 168, p. 6771–5777, 2002.

PARODI, Cecilia; PADILLA, Angel Marcelo; BASOMBRÍO, Miguel Angel. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. Suppl. I, p. 288–294, 2009.

PARRA, L E *et al.* Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, v. 25, p. 2180–2186, 2007.

PEREIRA, Cristiano G. *et al.* Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Veterinary Parasitology*, v. 165, n. 3–4, p. 231–240, 2009.

PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease. *The Lancet*, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.

PETERS *et al.* In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science*, v. 321, 2008.

PETERS, Nathan; SACKS, David. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunological Reviews*, v. 213, n. 1, p. 159–179, 2006.

PONTE-SUCRE, Alicia *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet*, v. 1, p. 92–100, 2001.

PURKAIT, Bidyut *et al.* Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 1031–1041, 2012.

QUIJANO-HERNANDEZ, Israel; DUMONTEIL, Eric. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines*, v. 7, n. 11, p. 1184–1191, 2011.

RAHMAN, Mahmudur *et al.* Phase IV Trial of Miltefosine in Adults and Children for Treatment of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar) in Bangladesh. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 1, p. 66–69, 2011.

RAKONJAC, Jasna *et al.* Filamentous Phage: Structure and Biology. *Recombinant Antibodies for Infectious Diseases*. [S.l: s.n.], 2017. p. 1–20.

RAMAN, Vanitha S. *et al.* Adjuvants for *Leishmania* vaccines: From models to clinical application. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. JUN, p. 1–15, 2012.

RAMOS, Fernanda Fonseca *et al.* Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against

Leishmania infantum infection. *Parasite & Vectors*, p. 1–14, 2017.

RASSI JR, Anis; RASSI, Anis; LITTLE, William C. Chagas' heart disease. *Clinical Cardiology*, v. 23, n. 12, p. 883–889, 2000.

RASSI JR, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. *The Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)>.

READY, Paul D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, v. 6, n. 1, p. 147–154, 2014.

REED, S G *et al.* IL-10 mediates susceptibility to Trypanosoma cruzi infection. *Journal of immunology*, v. 153, n. 7, p. 3135–40, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089491>>.

REED, Steven G.; COLER, Rhea N.; CAMPOS-NETO, Antonio. Development of a Leishmaniasis vaccine: The importance of MPL. *Expert Review of Vaccines*, v. 2, n. 2, p. 239–252, 2003.

REES, C. A. *et al.* Neglected tropical diseases in children: An assessment of gaps in research prioritization. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007111>>.

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

REQUENA-MÉNDEZ, Ana *et al.* Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe : A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, p. 1–15, 2015.

RHAIEM, Rafik Ben; HOUIMEL, Mehdi. Targeting Leishmania major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. *Acta Tropica*, v. 159, p. 11–19, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.018>>.

RIBEIRÃO, M *et al.* Chagasic patients develop a type 1 immune response to Trypanosoma cruzi trans-sialidase. *Parasite Immunology*, v. 22, p. 49–53, 2000.

RIJAL, S *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis in south-eastern Nepal : decreasing efficacy of sodium stibogluconate and need for a policy to limit further decline. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 97, p. 350–354, 2003.

RIJAL, Suman *et al.* Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. *Clinical Infectious Diseases*, v. 56, n. 11, p. 1530–1538, 2013.

RIOS, Lizette E *et al.* Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, v. 200, p. 105168, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105168>>.

ROATT, Bruno Mendes *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, p. 8965–8977, 2020.

RODI, Diane J.; MAKOWSKI, Lee. Phage-display technology - Finding a needle in a vast molecular haystack. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, n. 1, p. 87–93, 1999.

RODI, Diane J; SOARES, Alexei S; MAKOWSKI, Lee. Quantitative Assessment of Peptide Sequence Diversity in M13 Combinatorial Peptide Phage Display Libraries. *Journal of Molecular Biology*, v. 322, p. 1039–1052, 2002.

RODRIGUES, Mauricio M; OLIVEIRA, Ana Carolina; BELLIO, Maria. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi* : Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *Journal of Parasitology Research*, 2012.

RODRÍGUEZ-MORALES, Olivia *et al.* Experimental Vaccines against Chagas Disease : A Journey through History. *Journal of Immunology Research*, v. 2015, 2015.

RODRÍGUEZ, Eva V Acosta *et al.* Review Understanding CD8 + T Cell Immunity to *Trypanosoma cruzi* and How to Improve It. *Trends in Parasitology*, v. 35, n. 11, p. 899–917, 2019.

ROSTAMIAN, Mosayeb *et al.* Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 50, n. 2, p. 160–166, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2015.05.007>>.

SACKS, David; NOBEN-TRAUTH, Nancy. The Immunobiology of Susceptibility and Resistance to *Leishmania major* in Mice. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. November, p. 845–858, 2002.

SÁENZ-GARCIA, José L. *et al.* Targeting epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* with a peptide isolated from a phage display random library. *Experimental Parasitology*, v. 210, n. January, p. 107830, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107830>>.

SALVADOR, Fernando *et al.* Serum IL-10 levels and its relationship with parasitemia in chronic Chagas disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 1, p. 159–163, 2020.

SAMOYLOVA, Tatiana I *et al.* Infective and inactivated filamentous phage as carriers for immunogenic peptides. *Journal of Virological Methods*, v. 183, n. 1, p. 63–68, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.03.032>>.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J. *et al.* A Monoallelic Deletion of the TcCRT Gene Increases the Attenuation of a Cultured *Trypanosoma cruzi* Strain , Protecting against an In Vivo Virulent Challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 2, p. e2696, 2014.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F J *et al.* Gene-deleted live-attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as vaccines to protect against Chagas disease. *Expert Review of Vaccines*, v. 14, n. 5, p. 681–697, 2015.

SANGENITO, Leandro Stefano *et al.* Leishmaniasis and Chagas Disease – Neglected Tropical Diseases: Treatment Updates. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 3, p. 174–177, 2019.

SANTOS, Emily F *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018 : A nationwide spatiotemporal analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 8, p. 1–16, 2020.

SARAVIA, Nancy Gore *et al.* Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. *Vaccine*, v. 24, p. 4247–4259, 2006.

SAVOIA, Dianella. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCHIÖTT, A. *et al.* CD27- CD4+ memory T cells define a differentiated memory population at both the functional and transcriptional levels. *Immunology*, v. 113, p. 363–370, 2004.

SCHROEDER, Juliane; AEBISCHER, Toni. Vaccines for leishmaniasis: From proteome to vaccine candidates. *Human Vaccines*, v. 7, n. SUPPL., p. 10–15, 2011.

SCOTT, Jamie K; SMITH, George P. Searching for Peptide Ligands Epitope Library with an Epitope Library. *Science*, v. 249, n. 4967, p. 386–390, 1990.

SCOTT, Phillip. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology*, v. 7, n. 12, p. 1707–1713, 2005.

SCOTT, Phillip. Long-Lived Skin-Resident Memory T Cells Contribute to Concomitant Immunity in Cutaneous Leishmaniasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 12, n. 10, p. a038059, 2020.

SELVAPANDIYAN, A. *et al.* Intracellular Replication-Deficient *Leishmania donovani* Induces Long Lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 3, p. 1813–1820, 2009.

SELVAPANDIYAN, Angamuthu *et al.* Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 24, p. 25703–25710, 2004.

SELVAPANDIYAN, Angamuthu *et al.* Expression of a Mutant Form of *Leishmania donovani* Centrin Reduces the Growth of the Parasite. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 46, p. 43253–43261, 2001.

SELVAPANDIYAN, Angamuthu *et al.* Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, 2012.

SERNA, Carylinda *et al.* A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated

surface protein as candidate for a vaccine against Chagas disease. *Vaccine*, v. 32, n. 28, p. 3525–3532, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.026>>.

SHAW, Jeffrey. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world . A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 541–547, 2007.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida; CARVALHO, Noemia Barbosa. Oral Transmission of Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.

SIDHU, Sachdev S. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Pharmaceutical Biotechnology*, v. 11, p. 610–616, 2000.

SIDHU, Sachdev S.; GEYER, Clarence Ronald. *Phage display in biotechnology and drug discovery*. [S.l: s.n.], 2015.

SIEGRIST, Claire-Anne. Vaccine Immunology. *Vaccines*. [S.l: s.n.], 2018. p. 16-34.e7.

SILVA, S J *et al.* Interleukin 10 and Interferon γ Regulation of Experimental Trypanosoma cruzi Infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 175, n. 1, p. 169–174, 1992.

SILVESTRE, Ricardo; CORDEIRO, Anabela; OUAISSI, Ali. Live attenuated Leishmania vaccines : a potential strategic alternative. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 56, n. 2, p. 123–126, 2008.

SINHA, Prabhat K *et al.* Phase 4 Pharmacovigilance Trial of Paromomycin Injection for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2011, 2011.

SMITH, George P.; PETRENKO, Valery A. Phage Display. *Chemical Reviews*, v. 97, n. 2, p. 391–410, 1997. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr960065d>>.

SMITH, George P. Filamentous Fusion Phage : Novel Expression Vectors that Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.

SOUZA, W. *et al.* Review on Trypanosoma cruzi : Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, p. 1–18, 2010.

SRIVASTAVA, Pankaj *et al.* Unusual Case of Resistance to Amphotericin B in Visceral Leishmaniasis in a Region in India Where Leishmaniasis Is Not Endemic □. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 8, p. 3088–3091, 2011.

SRIVASTAVA, Saumya *et al.* Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasite & Vectors*, v. 10, n. 49, p. 1–11, 2017.

SRIVASTAVA, Saumya *et al.* Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1553-y>>.

STÄGER, Simona; RAFATI, Sima. CD8+ T cells in Leishmania infections: Friends or foes?

Frontiers in Immunology, v. 3, n. JAN, p. 1–8, 2012.

STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, EPIDEMIOLOGIA, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

STIMPERT, K. K.; MONTGOMERY, S. P. Physician Awareness of Chagas Disease, USA. *Emerging infectious diseases*, v. 16, n. 5, p. 871–872, 2010.

SUNDAR, Shyam *et al.* Efficacy of Miltefosine in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India After a Decade of Use. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, n. 4, p. 543–550, 2012.

SUNDAR, Shyam *et al.* Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India : Report from the Center. *Clinical Infectious Diseases*, v. 31, n. 2, p. 1104–1107, 2000.

SUNDAR, Shyam *et al.* Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine*, v. 356, n. 25, p. 2571–2581, 2007.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 16, n. 2, p. 237–252, 2015.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Expert Opinion on Investigational Drugs Paromomycin in the treatment of leishmaniasis Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 17, n. 5, p. 787–794, 2008.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya; MEENA, Lalit P. Leishmaniasis: treatment , drug resistance and emerging therapies. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21678707.2019.1552853>>.

SUNDAR, Shyam; OLLIARO, Piero L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 3, n. 5, p. 733–740, 2007.

SUTTIE, Andrew W. *Histopathology of the Spleen*. [S.l.: s.n.], 2006. v. 34.

TAFURI, Wagner L. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: A remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 96, n. 3, p. 203–212, 2001.

TALVANI, André; TEIXEIRA, Mauro M. Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. *Advances in Parasitology*, v. 76, p. 171–194, 2011.

TARLETON, Rick L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 5–6, p. 550–554, 2001.

TEIXEIRA *et al.* A refined genome phage display methodology delineates the human antibody response in patients with Chagas disease. *iScience*, v. 24, n. 6, p. 102540, 2021.

TEIXEIRA *et al.* Trypanosoma cruzi Binds to Cytokeratin through Conserved Peptide Motifs Found in the Laminin-G-Like Domain of the gp85 / Trans-sialidase Proteins. *PLoS Neglected Tropical*

Diseases, v. 9, n. 9, p. 1–22, 2015.

TEIXEIRA, Clarissa R *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. *The Journal of Immunology*, v. 175, p. 8346–8353, 2005.

TIUMAN, Tatiana S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 15, n. 8, 2011.

TOLEDO-MACHADO, Christina Monerat; DE AVILA, Ricardo Andrez Machado; *et al.* Immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from phage displayed combinatorial libraries. *BioMed Research International*, v. 2015, n. Cvl, 2015.

TOLEDO-MACHADO, Christina Monerat; BUENO, Lilian Lacerda; *et al.* Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. *Parasites and Vectors*, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2015.

TONELLI, R. R.; COLLI, W.; ALVES, M. J.M. Selection of binding targets in parasites using phage-display and aptamer libraries in vivo and in vitro. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. JAN, p. 1–16, 2012.

TORRICO, Faustino *et al.* Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of Immunology*, v. 146, n. 10, 1991.

TRIPATHI, Parul; SINGH, Vinod; NAIK, Sita. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.

TRISCHMANN, Thomas M. *Trypanosoma cruzi*: Early Parasite Proliferation and Host Resistance in Inbred Strains of Mice. *Experimental Parasitology*, v. 62, p. 194–201, 1986.

TYLER, K M; ENGMAN, D M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 472–481, 2001.

VAN HOUTEN, Nienke E. *et al.* Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides. *Vaccine*, v. 28, n. 10, p. 2174–2185, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.059>>.

VAN REGENMORTEL, M H V. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. *Biologicals*, v. 29, p. 209–213, 2001.

VÉLEZ, Iván D. *et al.* Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania (L.) amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, p. 698–703, 2000.

VELEZ, R *et al.* Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 162, p. 67–75, 2019.

VIOTTI, Rodolfo *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease : fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 7, n. 2, p. 157–163, 2009.

VOGT, Javier *et al.* Impaired *Trypanosoma cruzi* -specific IFN- γ secretion by T cells bearing the BV9 T-cell receptor is associated with local IL-10 production in non-lymphoid tissues of chronically infected mice. *Microbes and Infection*, v. 10, p. 781–790, 2008.

VON STEBUT, Esther; UDEY, Mark C. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes and Infection*, v. 6, p. 1102–1109, 2004.

VOTÝPKA, J. *et al.* New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology*, v. 31, n. 10, p. 460–469, 2015.

WANG, Lin-Fa; YU, Meng. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Current Drug Targets*, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14738215>>.

WATANABE, Hiroyuki *et al.* Innate Immune Response in Th1- and Th2-Dominant Mouse Strains. *SHOCK*, v. 22, n. 5, p. 460–466, 2004.

WHERRY, E. John *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8T cell subsets. *Nature Immunology*, v. 4, n. 3, p. 225–234, 2003.

WHO. *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/chagas-disease>>.

WHO. *Chagas disease Fact Sheet*.

WHO. CONTROL OF CHAGAS DISEASE Second report of the WHO Expert Committee. *World Health Organization*, 2002.

WHO. Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. *World Health Organization*, 2020b.

WHO. Expert Committee. Control of the Leishmaniases. Technical Report Series. *World Health Organization*, n. 949, 2010.

WHO. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. *World Health Organization*, 2017a.

WHO. *Leishmaniasis Fact Sheet*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 3 jun. 2021b.

WHO. *Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis: 2019*. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html>. Acesso em: 3 jun. 2021a.

WHO. *Status of endemicity of visceral leishmaniasis: 2019*. Disponível em:

<https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html>. Acesso em: 3 jun. 2021b.

WHO. Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Health organization*, v. 92, n. 38, p. 557–572, 2017b. Disponível em: <<http://www.who.int/wer>>.

WILLATS, William G.T. Phage display: Practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, v. 50, n. 6, p. 837–854, 2002.

WILLIS, Anne E; PERHAM, Richard N; WRAITH, David. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene*, v. 128, p. 79–83, 1993.

WILSON, Mary E.; JERONIMO, Selma M.B.; PEARSON, Richard D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis*, v. 38, n. 4, p. 147–160, 2005.

WOELBING, Florian *et al.* Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc γ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *JEM*, v. 203, n. 1, p. 177–188, 2006.

WYLIE, C E *et al.* A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. *Preventive Veterinary Medicine*, 2014.

WYLLIE, Susan; CUNNINGHAM, Mark L; FAIRLAMB, Alan H. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 38, p. 39925–39932, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M405635200>>.

YOUNIS, Brima M *et al.* Safety and immunogenicity of ChAd63-KH vaccine in post-kala-azar dermal leishmaniasis patients in Sudan. *Molecular Therapy*, v. 29, n. 7, p. 1–12, 2021.

YOUSSEFI, Mohammad Reza *et al.* In Vitro and in Vivo Effectiveness of Carvacrol, Thymol and Linalool against *Leishmania infantum*. *Molecules*, v. 24, n. 11, p. 1–11, 2019.

ZAGO, M Paola *et al.* Impairment of Infectivity and Immunoprotective Effect of a LYT1 Null Mutant of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 1, p. 443–451, 2008.

ZAPH, Colby *et al.* Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nature Medicine*, v. 10, n. 10, p. 1104–1110, 2004.

ZHANG, Wen-Wei *et al.* A second generation leishmanization vaccine with a markerless attenuated *Leishmania major* strain using CRISPR gene editing. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2020.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>>.

ANEXOS

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Aplicação de mimotopos no desenvolvimento de vacina contra as leishmanioses", protocolo do CEUA: 65/2018 sob a responsabilidade de Ricardo Toshio Fujiwara que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/05/2018.

Vigência da Autorização	21/05/2018 a 20/05/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	40
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	24
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	24
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	24
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	24
Peso/Idade	20g / 8(semanas)

Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	24
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	24
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

21/05/2018	Aprovado na reunião do dia 21/05/2018. Validade: 21/05/2018 à 20/05/2023
------------	--

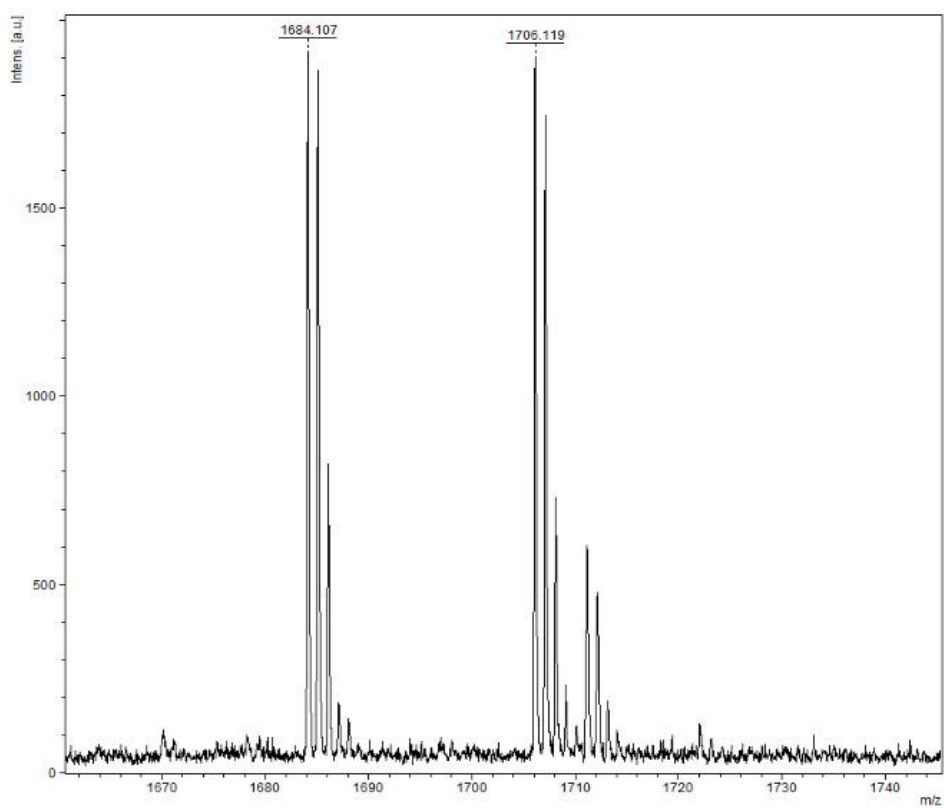
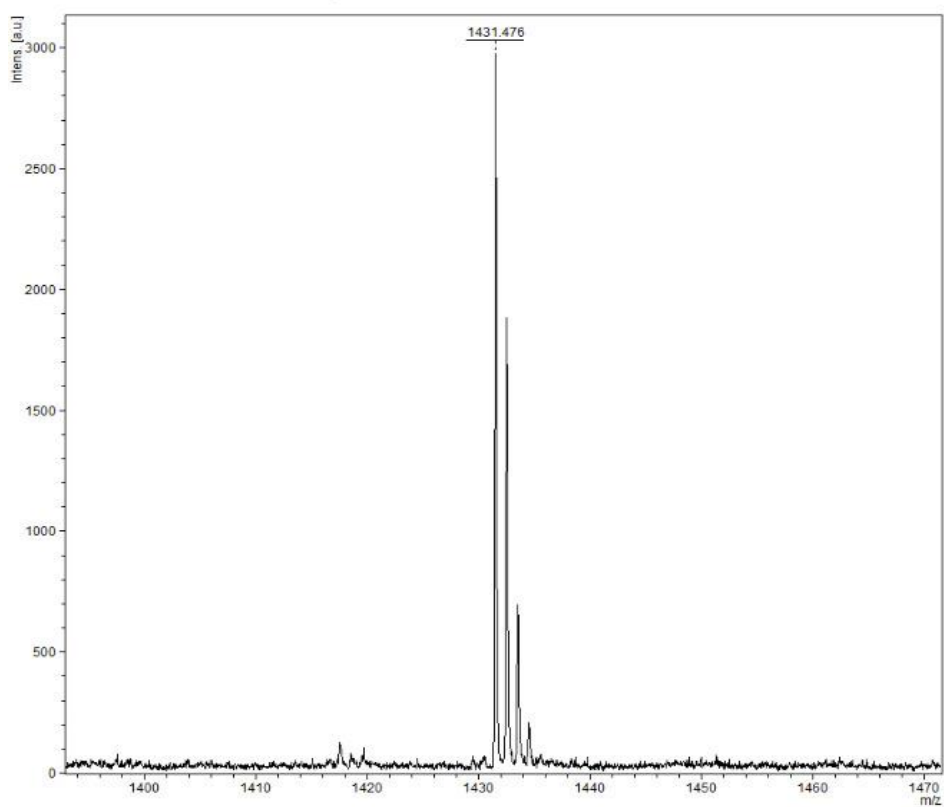
Belo Horizonte, 27/05/2018.

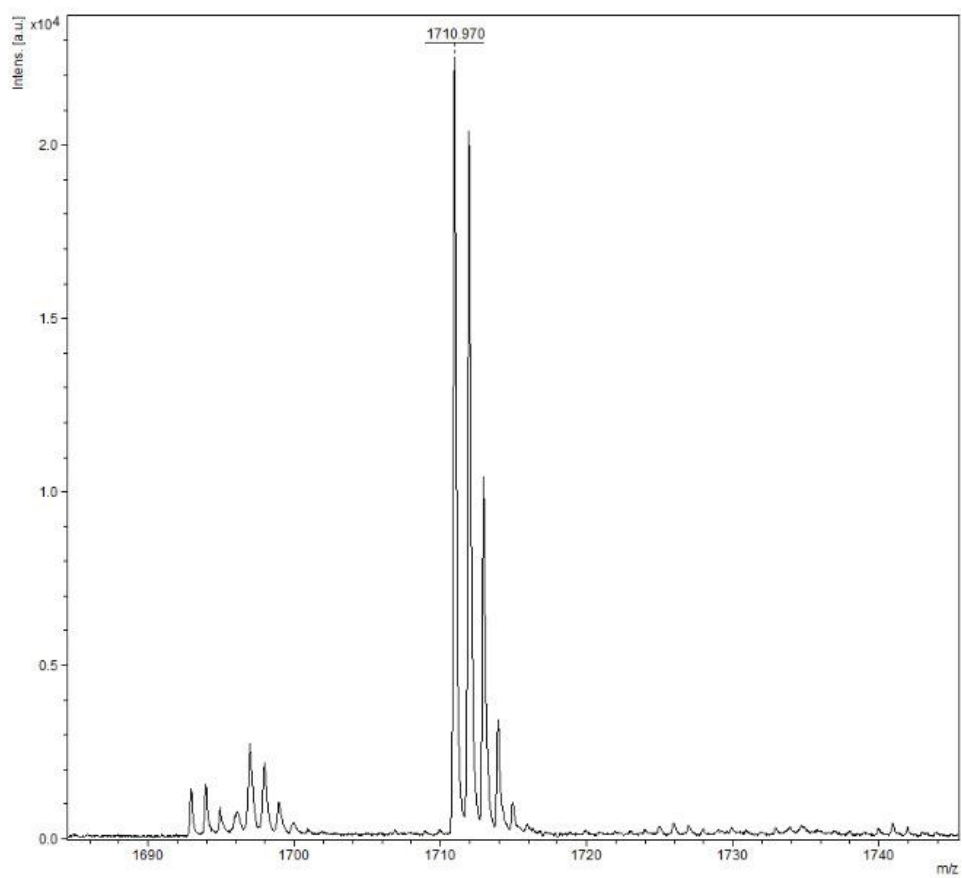
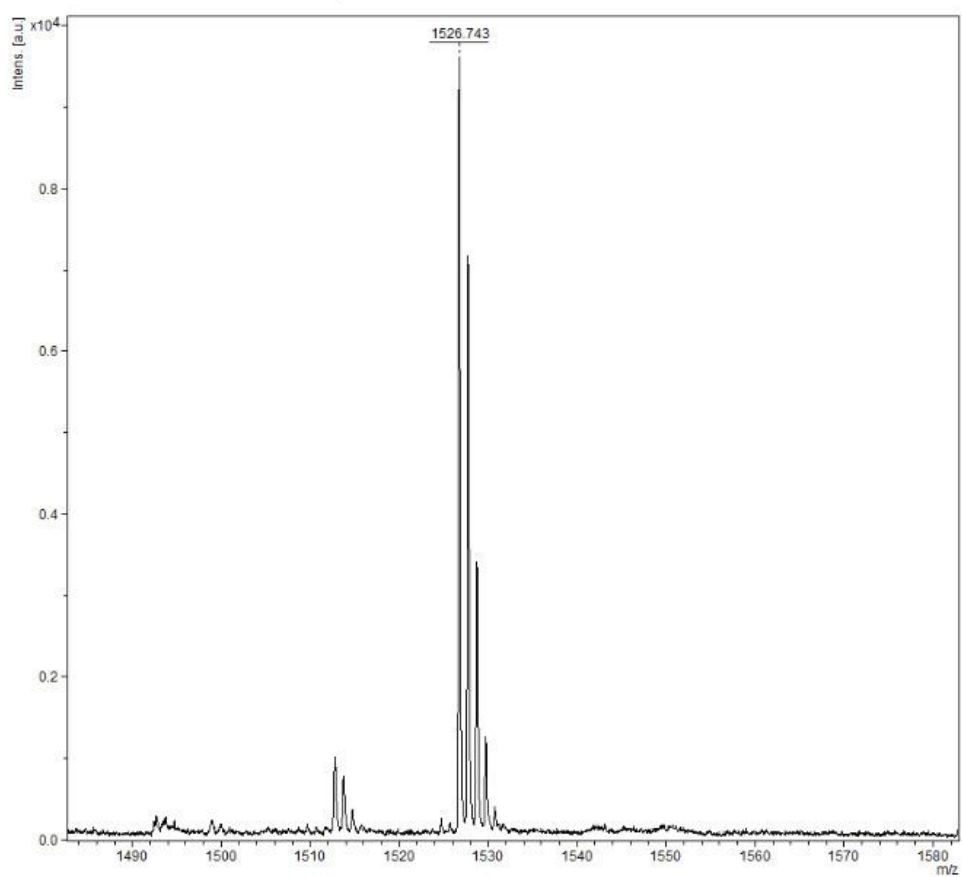
Atenciosamente,

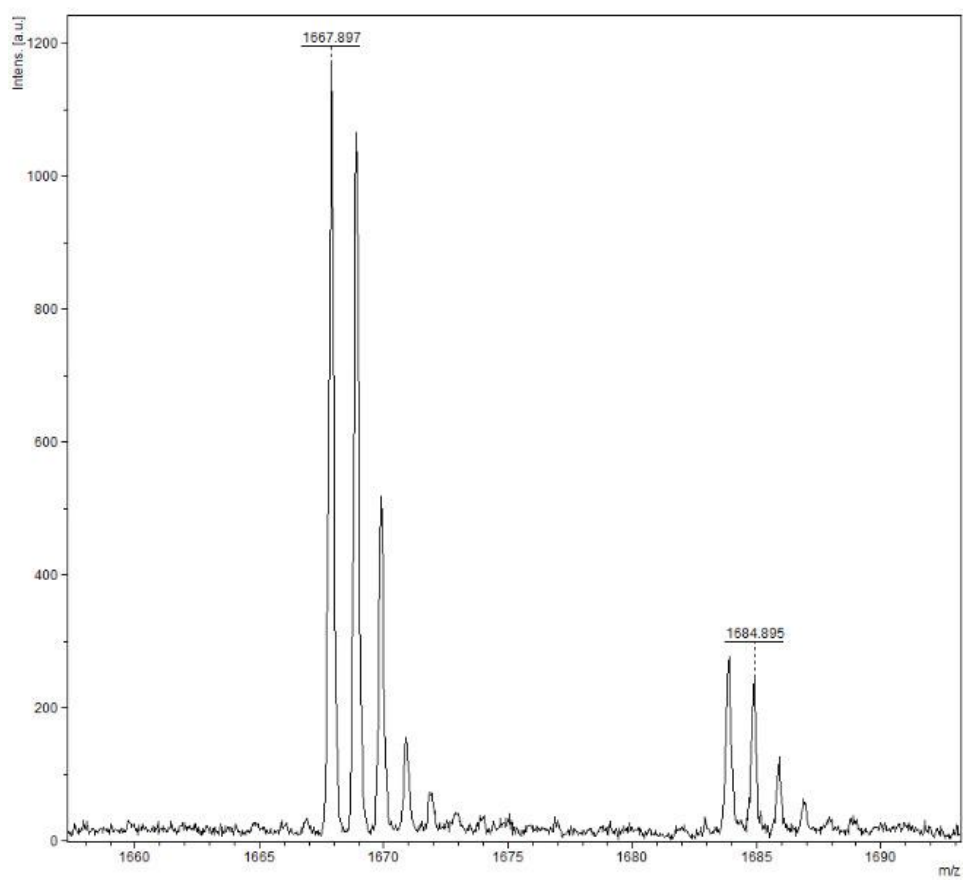
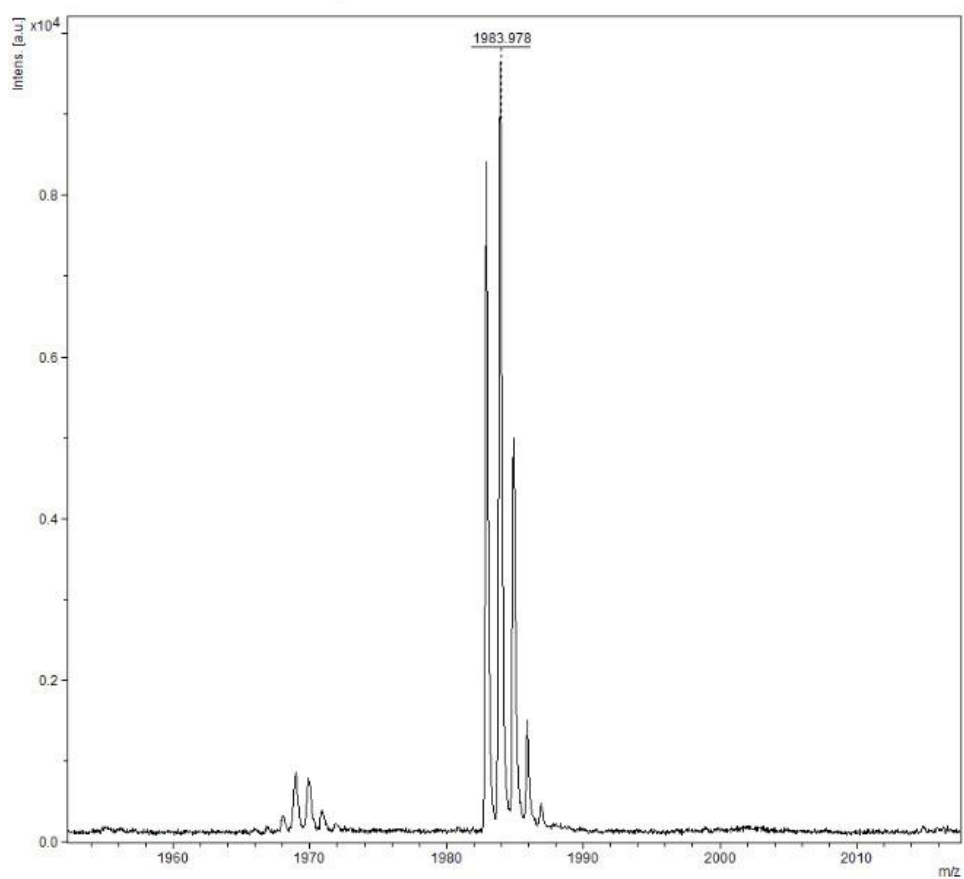
Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

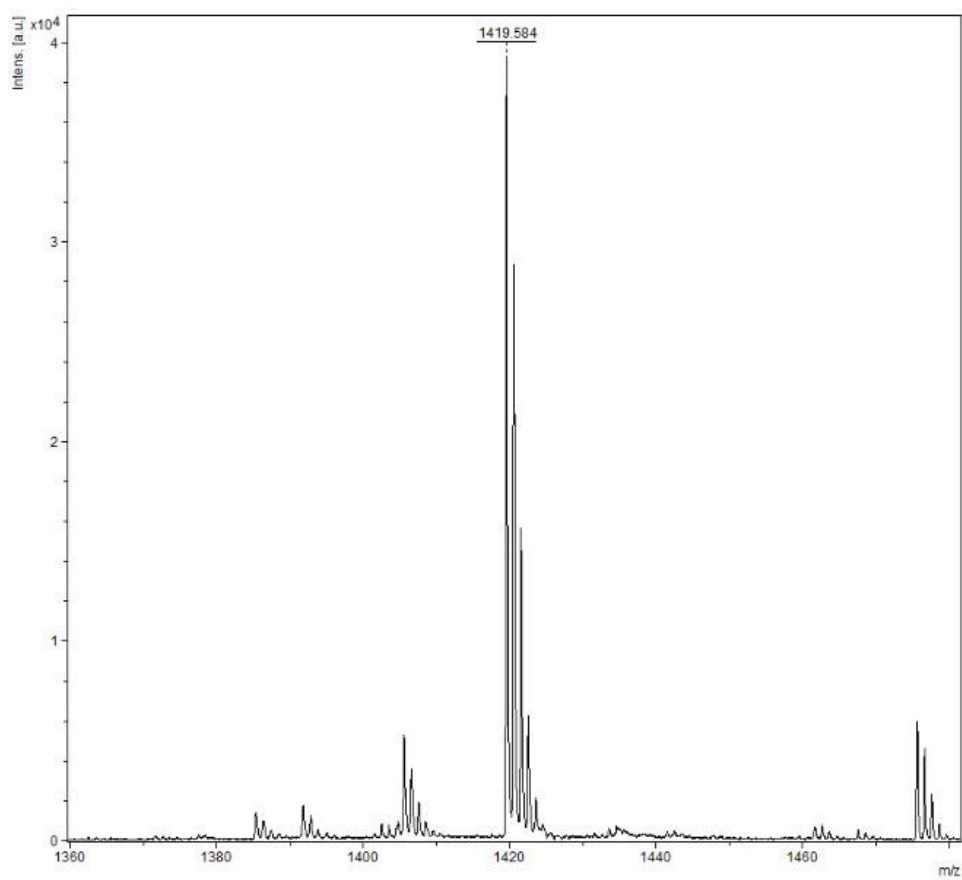
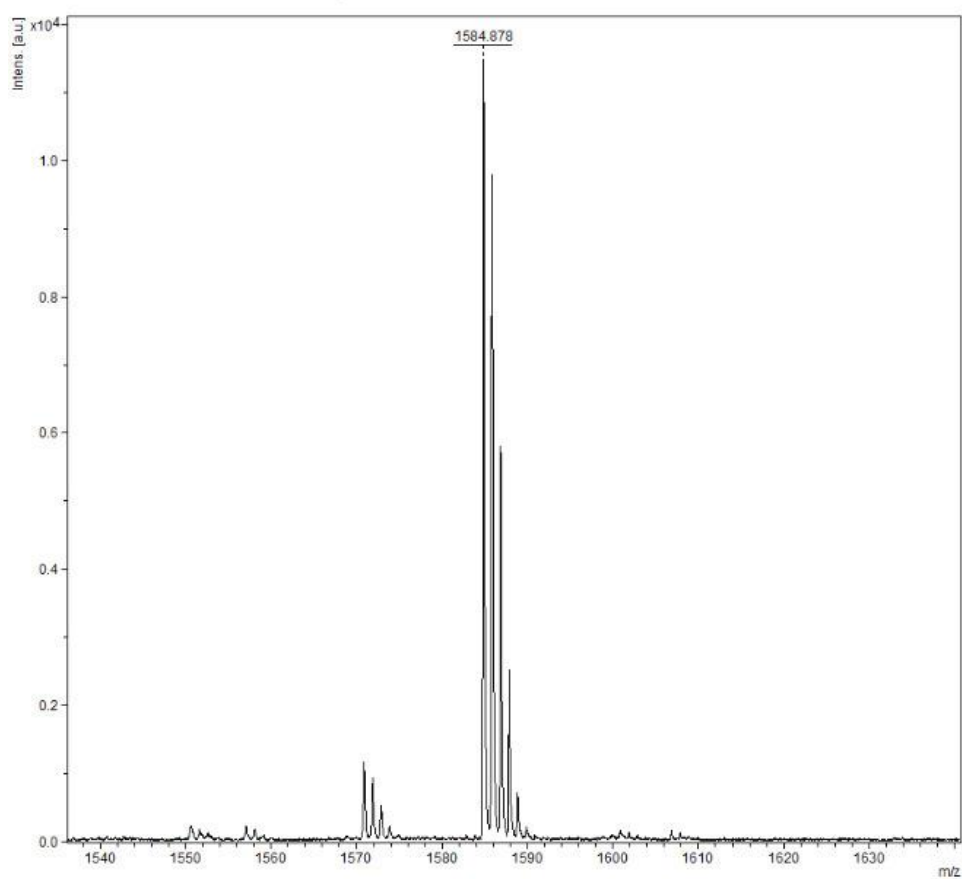
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

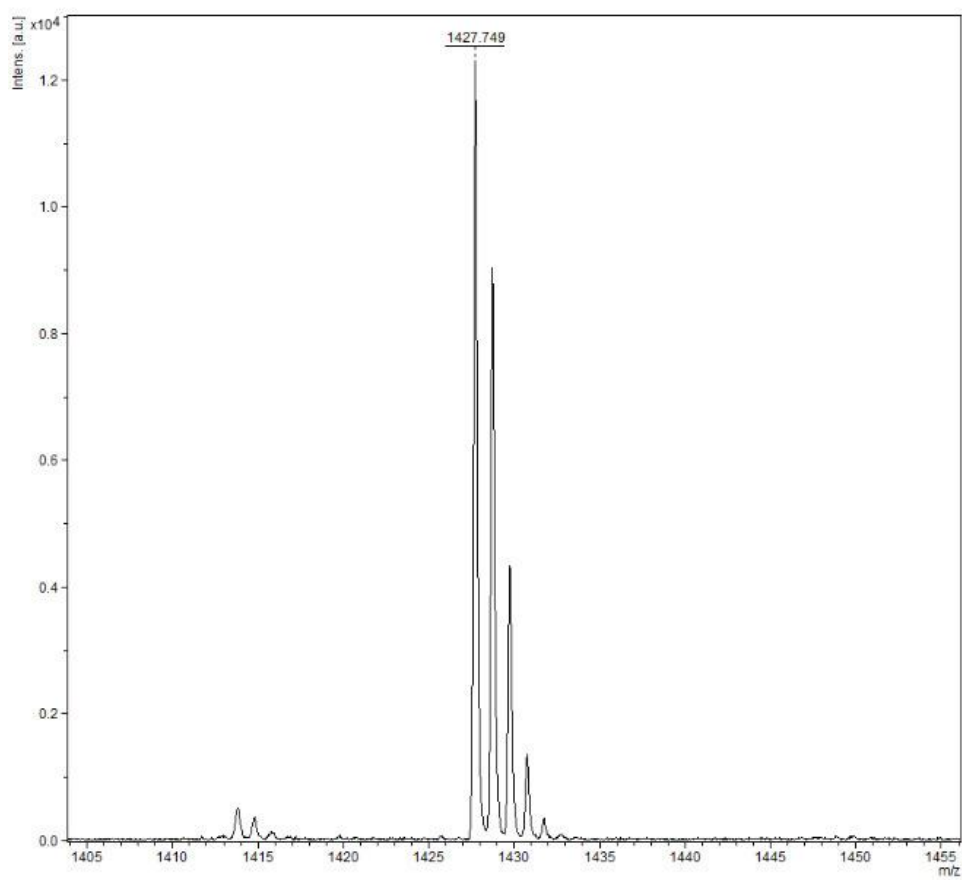
ANEXO II

Peptídeo 1 MW:1684.19 g/mol**Peptídeo 2 MW:1431.69 g/mol**

Peptideo 3 MW:1710.93 g/mol**Peptideo 4 MW:1526.79 g/mol**

Peptideo 5 MW:1645.88 g/mol**Peptideo 6 MW:1983.87 g/mol**

Peptideo 7 MW:1419.64 g/mol**Peptideo 8 MW:1584.98 g/mol**

Peptideo 9 MW:1427.66 g/mol**Peptideo 10 MW:1989.24 g/mol**