

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

Scarleth Silva Costa

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS DE *Leishmania infantum*
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOPROTEÔMICA COM APLICAÇÃO PARA O
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E COMPOSIÇÕES VACINAIS CONTRA A
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Belo Horizonte

2021

Scarleth Silva Costa

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS DE *Leishmania infantum*
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOPROTEÔMICA COM APLICAÇÃO PARA O
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E COMPOSIÇÕES VACINAIS CONTRA A
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestra junto ao referido Programa.

Orientadora: Prof. Dra Mariana Costa Duarte -
UFMG

Co-Orientadores: Prof. Dr. Daniel Menezes
Souza -UFMG

Belo Horizonte

2021

Costa, Scarleth Silva.
C837i Identificação de novos antígenos de *Leishmania infantum* através da técnica de imunoproteômica com aplicação para o diagnóstico sorológico e composições vacinais contra a leishmaniose visceral canina [recurso eletrônico]. / Scarleth Silva Costa. - - Belo Horizonte: 2021.
89 f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Mariana Costa Duarte.
Coorientador (a): Daniel Menezes de Souza.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Biomarcadores. 2. Espectrometria de Massas. 3. Proteômica. 4. Leishmania. 5. Descritor. 6. Dissertação Acadêmica. I. Duarte, Mariana Costa. II. Souza, Daniel Menezes de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 243

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

"IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS DE *Leishmania infantum* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOPROTEÔMICA COM APLICAÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E COMPOSIÇÕES VACINAIS CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA"

SCARLETH SILVA COSTA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 14 de janeiro de 2021, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

PROFA. MARIANA COSTA DUARTE - Orientadora

UFMG

PROF. DANIEL MENEZES DE SOUZA - Coorientador

UFMG

DRA. VIVIAN TAMIETTI MARTINS

UFMG

DR. DANIEL SILVA DIAS

UFMG

Belo Horizonte, 14 de janeiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Costa Duarte, Professora Ensino Básico Técnico Tecnológico**, em 14/01/2021, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Tamie Martins, Usuário Externo**, em 14/01/2021, às 16:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Menezes Souza, Professor Ensino Básico Técnico Tecnológico**, em 14/01/2021, às 18:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Silva Dias, Usuário Externo**, em 14/01/2021, às 19:12, 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 **0502983** e o código CRC **93F9A7A8**.



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 **0502983** e o código CRC **93F9A7A8**.

AGRADECIMENTOS

Hoje se completa mais uma etapa em minha vida, e a cada degrau de dificuldade Deus me proporcionou o dobro de força, e por isso quero agradecer primeiramente a ele pela bênção e por mais essa conquista, quero agradecer também pelos momentos tão especiais ao longo desses dois anos e pelas pessoas que conheci nessa caminhada. Nessa etapa da minha vida contei com pessoas especiais que me ajudaram muito, quero agradecer a minha orientadora querida Mariana Costa Duarte, que abriu as portas do seu laboratório me acolhendo com todo carinho e dedicação, teve toda paciência e compreensão do mundo para lidar com as minhas dificuldades nos experimentos para a concretização deste trabalho, obrigada Mari por sua orientação. A minha família (Mãe, Avó e irmãs) fonte inesgotável de amor e doação, o meu muito obrigada por todo apoio e incentivo durante esses anos para continuar a estudar e me desenvolver profissionalmente, espero algum dia poder retribuir todo esse carinho. Aos amigos do laboratório, em especial a Naianda, Larissa, Lucas, Isabela, Ana Maria, Gabriel e Gabrielle pela disposição em ajudar nos experimentos e pelos momentos de tranquilidade, deixando os dias no laboratório mais leves, vocês são incríveis. A todos os Mestres que contribuíram transmitindo conhecimento e aqueles que foram parceiros de experimentos. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, e a CAPES pela bolsa que auxiliou na realização deste estudo. Obrigada a todos que de alguma forma participaram da minha trajetória e me ajudaram nessa evolução. Vocês fizeram parte desta realização!

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas, sobretudo por estarem vigentes em países em desenvolvimento. O Brasil concentra a maioria dos casos do continente americano, tornando-a um problema de Saúde Pública. São ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os parasitos promovem diferentes manifestações clínicas, e isso se dá pela interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro, bem como pela espécie que está parasitando. Isso posto, a leishmaniose visceral (LV) é atualmente a forma clínica mais grave, apresentando sintomas sistêmicos, que podem acabar levando ao óbito caso não seja tratada em tempo hábil, contudo, existem poucas opções terapêuticas realmente eficazes. Essa doença também pode atingir os cães, sendo eles os principais reservatórios. Atualmente possui uma alta prevalência de animais infectados nas cidades, sendo um grande potencial de risco para a transmissão da doença ao homem. Existem algumas estratégias de controle contra a doença preconizadas pelo ministério da saúde, como uso de inseticidas para combater o vetor, o diagnóstico e tratamento dos casos registrados e eutanásia dos cães soro positivos. Entretanto, essas medidas não têm sido suficientes para redução da incidência da doença no Brasil. Sendo assim, um estudo de imunoproteômica utilizando parasitos de *Leishmania infantum* isolados de extratos proteicos de cães naturalmente infectados de uma região endêmica para a doença foram utilizados para a identificação de novos antígenos para serem utilizados futuramente no diagnóstico sorológico e como candidatos a vacina na leishmaniose visceral canina. Para a realização dos géis bidimensionais foram utilizados extratos proteicos de cães sintomáticos e assintomáticos e na realização do Western-Blotting, utilizou-se *pool* de soros de cães com leishmaniose visceral assintomática, sintomática, cães saudáveis de área endêmica, cães com doenças correlacionadas (babesiose e erliquiose) em cães imunizados com a vacina Leish-Tec®. Com os resultados adquiridos, foi possível excluir os *spots* que apresentaram reatividade cruzada dos soros dos grupos de cães saudáveis, com babesiose e erliquiose. Ao todo foi possível identificar 20 proteínas, sendo 15 já descritas na literatura e 5 delas hipotéticas. Portanto, o presente estudo revela novos candidatos com potencial para serem empregados em estudos futuros na melhoria do diagnóstico da leishmaniose visceral, bem como para serem aplicados em uma formulação vacinal.

Palavras-chave: Biomarcadores; Espectrometria de Massas; Proteômica

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases, mainly because they are in force in developing countries. Brazil concentrates most cases on the American continent, making it a public health problem. They are caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The parasites cause different clinical manifestations, and this is due to the interaction between the parasite and the host's immune response, as well as the species that is parasitizing. That said, visceral leishmaniasis (VL) is currently the most serious clinical form, presenting systemic symptoms, which can end up leading to death if it is not treated in a timely manner, however, there are few really effective therapeutic options. This disease can also affect dogs, which are the main reservoirs. It currently has a high prevalence of infected animals in cities, being a great risk potential for the transmission of the disease to humans. There are some control strategies against the disease recommended by the Ministry of Health, such as the use of insecticides to combat the vector, the diagnosis and treatment of registered cases and euthanasia of positive serum dogs. However, these measures have not been sufficient to reduce the incidence of the disease in Brazil. Thus, an immunoproteomics study using *Leishmania infantum* parasites isolated from protein extracts from naturally infected dogs from an endemic region for the disease were used to identify new antigens to be used in the future for serological diagnosis and as candidates for vaccine in visceral leishmaniasis canine. Protein extracts from symptomatic and asymptomatic dogs were used to perform the two-dimensional gels and in the Western Blotting, a pool of sera from dogs with asymptomatic, symptomatic visceral leishmaniasis was used, healthy dogs from an endemic area, dogs with correlated diseases (babesiosis and ehrlichiosis) in dogs immunized with the Leish-Tec® vaccine. With the acquired results, it was possible to exclude the spots that presented cross-reactivity of the sera of the groups of healthy dogs, with babesiosis and ehrlichiosis. Altogether it was possible to identify 20 proteins, 15 of which have already been described in the literature and 5 of which are hypothetical. Therefore, the present study reveals new candidates with the potential to be used in future studies to improve the diagnosis of visceral leishmaniasis, as well as to be applied in a vaccine formulation. Visando um novo teste de sorodiagnóstico e uma composição vacinal

Keywords: Biomarkers; Mass Spectrometry; Proteomics

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Status de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo**.....22
- Figura 2: Ciclo de vida e transmissão da Leishmaniose.**24
- Figura 3:morfologia do parasito. (A) forma amastigota é encontrada em um formato mais arredondado e com flagelo rudimentar. (B) forma promastigota com morfologia afilada e com flagelo móvel**.....24
- Figura 4:Manifestações clínicas da leishmaniose visceral. A- Manifestações clínicas na fase inicial da doença; B- Manifestações clínicas na fase avançada da forma visceral da doença em humanos.**25
- Figura 5: Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). A- Alopecia e lesões da derme do cão; B- Onicogrifose no cão com LVC; C- Lesões de pele na região do focinho; D Caquexia em cão com LVC.**.....27
- Figura 6:Géis bidimensionais do extrato protéico de parasitos da espécie *Leishmania infantum* isolados de cães sintomáticos.** Géis 2D foram obtidos após a separação do extrato total das proteínas (250 µg) de parasitos de *L. infantum* isolados de cães sintomáticos (primeira dimensão: FIE pH 4-7 e a segunda dimensão: 12% SDS-PAGE). Os géis foram fixados e corados com Coomassie Brilliant Blue G-250. Os spots selecionados foram àqueles reconhecidos por anticorpos específicos presentes em pool de soro de cães sintomáticos, assintomáticos ou vacinados. Géis 2D foram realizados em quadruplicata, e uma amostra está representada.46
- Figura 7: Géis bidimensionais do extrato protéico de parasitos da espécie *Leishmania infantum* isolados de cães assintomáticos.** Géis 2D foram obtidos após a separação do extrato total das proteínas (250 µg) de parasitos de *L. infantum* isolados de cães assintomáticos (primeira dimensão: FIE pH 4-7 e a segunda dimensão: 12% SDS-PAGE). Os géis foram fixados e corados com Coomassie Brilliant Blue G-250. Os spots selecionados foram àqueles reconhecidos por anticorpos específicos presentes em pool de soro de cães sintomáticos, assintomáticos ou vacinados. Géis 2D foram realizados em quadruplicata e uma amostra está representada.46
- Figura 8:Análise Imunoproteômica das amostras de pool de soros de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no estágio promastigota isolados de cães assintomáticos.** Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum* no estágio

promastigota, que foram previamente isolados de cães assintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 a segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose e os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães não infectados (A), pool de soros de cães sintomáticos (B) e de cães assintomáticos (C). O conjugado utilizado foi anti IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (BenchMark TM Protein Ladder).47

Figura 9: Análise imunoproteômica da reatividade cruzada das amostras de pool de soros de cães com *Erlichia canis* e *Babesia canis* frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no estágio promastigota isolados de cães assintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães assintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose. Os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães infectados com *Erlichia canis* (A) ou pool de soros de cães infectados com *Babesia canis* (B). O conjugado utilizado foi anti IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (BenchMark TM Protein Ladder).48

Figura 10: Análise Imunoproteômica das amostras de pool de soros de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no estágio promastigota isolados de cães sintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães sintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose e os Immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães não infectados (A), pool de soros de cães sintomáticos (B) e de cães assintomáticos (C). O conjugado utilizado foi anti IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (BenchMark TM Protein Ladder).49

Figura 11: Análise Imunoproteômica da reatividade cruzada das amostras de pool de soros de cães frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no

estágio promastigota e isolados de cães sintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães sintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão: 12% SDS-PAGE), transferidos para membranas de nitrocelulose. Os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães com *E. canis* (A) ou pool de soros de cães infectados com *B. canis* (B). O conjugado utilizado foi IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (BenchMark TM Protein Ladder). 50

Figura 12: Análise imunoproteômica das amostras de pool de soros de cães imunizados com a leish Tec frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no estágio promastigota isolados de cães sintomáticos e assintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães (A) sintomáticos e (B) assintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose. Os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães vacinados. O conjugado utilizado foi anti IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (BenchMark TM Protein Ladder). 51

Figura 13: :Relação de spots identificados nos géis bidimensionais e immunoblotting dos isolados de cães sintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães sintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose e os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães sintomáticos, assintomáticos, *E. canis*, *B. canis*, vacinados e controle (cães saudáveis de área endêmica). O número de spots corresponde aos spots reativos nos immunoblotting. 52

Figura 14:Relação de spots identificados nos géis bidimensionais e immunoblotting dos isolados de cães assintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães assintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE, foram transferidos para membranas de nitrocelulose e os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães sintomáticos, assintomáticos,

erlichiose, babeéiose, vacinados e cães saudáveis de área endêmica. O número de spots corresponde aos spots reativos nos immunoblotting.	52
Figura 15: Proteínas identificadas dos parasitos da espécie L. infantum isolados de cães sintomáticos e assintomáticos. Percentual de proteínas identificadas por imunoproteômica, após análise por espectrometria de massas de acordo com o extrato total de proteínas de L. infantum avaliado (cães sintomáticos ou assintomáticos).	53
Figura 16: Sequências de aminoácidos e nucleotídeos: Sequência de aminoácidos e nucleotídeos utilizados para a construção da quimera para o diagnóstico da LVC.	58
Figura 17: Confirmação da região de sequências de peptídeo para construção da quimera para o diagnóstico sorológico: Sequência dos peptídeos para construção da quimera para validação como marcador sorológico. Os peptídeos foram agrupados linearmente com espaçamento de duas glicinas entre cada peptídeo e foram dispostos para se assemelhar à disposição em sua proteína da origem.	58
Figura 18: Sequências de aminoácidos e nucleotídeos: Sequência de aminoácidos e nucleotídeos utilizados para a construção da quimera para a composição vacinal contra a LVC.	60
Figura 19: Confirmação da região de sequência de peptídeos para construção da quimera para vacina: Sequência dos peptídeos para construção da quimera para validação como vacina. Os peptídeos foram agrupados linearmente com espaçamento de duas glicinas entre cada peptídeo e foram dispostos para se assemelhar à sua disposição da proteína de origem.	60

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Proteínas identificadas no extrato total de formas promastigotas de Leishmania infantum. a) Nome da proteína (L. infantum); b) Número do spot identificado c) Número de acesso de acordo com TritypDB; d) Cobertura; e) AVG. MASS (DA); f) Ponto isoelétrico predito (pI); g) Peso molecular predito (em kDa); h) spot de acordo com o extrato dos cães.</i>	55
Tabela 2: Proteínas selecionadas para a construção da Quimera para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina.	57
Tabela 3: Proteínas selecionadas para a construção da Quimera para uma composição vacinal contra a Leishmaniose Visceral Canina	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AST- Aspartato aminotransferase

C18- 18 carbonos

Cbab- Cães com babesiose

Cerl- Cães com erliquiose

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais

CLVA- Cães com leishmaniose visceral assintomática

CLVS- Cães com leishmaniose visceral sintomática cm-

Centímetro

CT- Cães saudáveis não infectados

CV- Cães vacinados

Da- Dalton

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DPP®- Plataforma de duplo percurso (do inglês Dual-Path Platform)

DTE- Ditioeritritol

DTT- Ditiotreitól

ELISA- Ensaio

imunoenzimático g- Força

gravitacional HCl- Ácido

clorídrico IEF-

Isoeletrofocalização

IFN γ - Interferon gama

IgG- Imunoglobulina G

IL-2- Interleucina 2

IL-12- Interleucina 12

IPG- Gradiente de pH imobilizado (do inglês immobilized pH gradient)

Kda- Quilo Daltons

Kg- Quilograma

KV- Quilovolt

L- *Leishmania*

LC-MS/MS- Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (do inglês liquid chromatography with tandem mass spectrometry)

LIT- Infusão de fígado e triptose (do inglês Liver Infusion Triptose)

LT- Leishmaniose tegumentar

LV- Leishmaniose visceral LVC-

Leishmaniose visceral canina m-

mAmpère mg- Miligrama

MGFs- Materials And Geometry Format

MHz- Megahertz

Min- Minuto ml-

Mililitro mm-

Milímetro mM-

Milimolar

MS/MS- Espectrometria de massas em tandem (do inglês mass spectrometry)

MW- Peso molecular m/z- Massa/carga ng/ml- Nanograma/mililitro

NNN- Novy, MacNeal e Nicolle

PBS-T- Tampão fosfato-salina com tween 20 (do inglês phosphate buffered saline with tween 20)

PCR- Reação em cadeia da polimerase

pH- Potencial Hidrogeniônico PI-

Ponto Isoelétrico p/v- Peso/volume

RIFI- Reação de imunofluorescência indireta

SDS-PAGE- Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

SUS- Sistema Único de Saúde

TBS-T- Tampão tris-salino com tween 20 (do inglês tris buffered saline with tween 20)

TNF Fator de necrose tumoral (do inglês tumor necrosis factor)

Th1- Linfócito T helper 1

Tris- Tris(hidroximetil)aminometano

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP- Universidade Federal de Ouro Preto v-

Volume V- Volt

V/h- Volt/hora

WB- Western blotting

2D- Bidimensional

2-DE- Gel bidimensional

°C- Graus Celsius μg -

Micrograma μL -

Microlitro

%- Porcentagem

> - Maior que

< - Menor que

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. Leishmanioses: Etiologia e aspectos gerais.....	19
2.2. Epidemiologia da leishmaniose visceral.....	20
2.4. Biologia e ecologia dos flebotomíneos e ciclo biológico da <i>leishmania ssp.</i>	22
2.5. Manifestações clínicas da LV Humana e LV Canina	24
2.6. Medidas de controle	27
2.7. Diagnósticos da LVC.....	27
2.8. Desenvolvimento de Vacinas	31
2.9. Proteômica e imunoproteômica	33
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Parasitos.....	37
4.2. Amostras de Soro	38
4.3. Eletroforese Bidimensional	39
4.3.1. Preparação dos extratos protéicos de <i>Leishmania infantum</i>	39
4.3.2. Migração em primeira dimensão - Isoeletrofocalização (IEF)	39
4.3.2.1. Preparo das amostras	39
4.3.2.2. Reidratação das strips	40
4.3.2.3. Isoeletrofocalização.....	40
4.3.3. Equilíbrio das strips	40
4.3.4. Migração em segunda dimensão – GEL SDS-PAGE.....	40
4.4. Western Blotting e análise dos spots	41
4.5. Digestão tríptica, extração dos peptídeos e espectrometria de massas	41
4.6. Identificação das proteínas e pesquisa em banco de dados.....	42
4.7. Predição de epítomos das proteínas de <i>Leishmania</i>	42
4.8. Construção da proteína quimérica.....	44
5. RESULTADOS	45

5.1. Análise dos mapas proteômicos dos extratos de <i>L. infantum</i> de cães sintomáticos e assintomáticos identificados nos géis 2D e Western Blotting.....	45
5.2. Identificação de proteínas de promastigota de <i>Leishmania infantum</i> por MS/MS e suas características em banco de dados	51
5.3. Predição dos peptídeos e construção de uma proteína multi epítopo para validação no	57
sorodiagnostics da Leishmaniose Visceral Canina	57
5.4. Predição dos peptídeos e construção de uma proteína multiepitopo para uso em uma composição vacinal contra a Leishmaniose Visceral Canina	59
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO	69
8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO	70
9 REFERÊNCIAS:	71
10 ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO

No complexo cenário mundial as leishmanioses são doenças negligenciadas que possuem alta incidência anual com grande porcentagem de óbitos, sendo necessário medidas de controles eficazes para a diminuição dos casos e contenção da doença (BAILEY *et al.*, 2019; WHO, 2020). As leishmanioses são infecções tropicais causadas por diversos protozoários digenéticos do gênero *Leishmania* (ROSS 1903). São descritas na literatura pelo menos 22 espécies diferentes de *Leishmania* que causam doenças em humanos (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

As infecções causadas pelo protozoário *Leishmania* possuem uma variedade de sinais clínicos, que podem variar de acordo com a espécie, a virulência da cepa, localização do parasito nos tecidos infectados, tipos de vetores, bem como a resposta imunológica e genética do hospedeiro perante o parasito (GOTO & LINDOSO, 2010; PAHO, 2018). Todavia, independente da espécie do parasito, a doença é transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas infectados durante o repasto sanguíneo. Existem diversas espécies desse vetor que podem propagar a *Leishmania* no mundo.

A *Leishmania infantum* é uma das principais espécies responsável por ocasionar a doença em sua forma visceral e é encontrada tanto no velho e novo mundo, assim, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020) como uma das principais doenças negligenciadas do mundo, ocasionando um grande problema de saúde (MARINHO *et al.*, 2015; BAILEY *et al.*, 2019; WHO, 2020). A leishmaniose visceral (LV) ocasiona sintomas clínicos graves e sistêmicos, como: crises irregulares de febre, que permanecem por longo período, perda substancial de peso, fraqueza, com redução da força muscular, aumento do baço e fígado, inchaço dos nódulos linfáticos, além de anemia, caracterizando a forma aguda da infecção (BAHARIA *et al.*, 2015; KHADEMVATAN *et al.*, 2016).

As leishmanioses são amplamente distribuídas e podem ser consideradas endêmicas em 98 países, apresentando maiores índices de infecções em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão. Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas estão em risco de adquirir a infecção por leishmaniose. Ocorre anualmente o registro de aproximadamente 30.000 novos casos de leishmaniose visceral e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose tegumentar. (WHO, 2021). A infecção se caracteriza primeiramente como uma zoonose, mas sabe-se que a mesma também pode ser designada como uma antropozoonoses ou antroponosos dependendo da espécie. O parasito *Leishmania* possui um ciclo heteroxênico, onde precisa ter duas classes de

hospedeiros, sendo um considerado como hospedeiro intermediário (invertebrado) e outro definitivo (mamífero) (AKHOUNDI *et al.*, 2016). O protozoário possui diversos mamíferos como reservatório que podem variar de acordo com o exemplar da espécie, sendo para a LV o cão um dos mais importantes. Entretanto, somente a minoria dos cães infectados desenvolve a doença, visto que a grande maioria apresenta casos subclínicos (QUEIROZ *et al.*, 2010). Portanto, esses animais que são assintomáticos possibilitam a transmissão da LV em áreas urbanas endêmicas para os seres humanos e passam a representar um grande desafio para o controle da infecção (ABRANCHES *et al.*, 1998; DE MENDONÇA *et al.*, 2016).

Diante da característica zoonótica da doença torna-se imprescindível a adoção de medidas competentes para interromper o ciclo do parasito (TESH, 1995). Entretanto, as medidas de controle empregadas atualmente não têm sido suficientes para diminuir a propagação da doença, por esse fator o elevado número de casos de leishmaniose no mundo. (TESH, 1995; GONTIJO & MELO, 2004).

No ano de 2016, foi liberado no Brasil o tratamento de cães com LV utilizando a miltefosina, contudo, esse plano também não tem se demonstrado eficiente visto que pode gerar recidivas, toxicidade e resistência ao fármaco, além permitir que os animais permaneçam como reservatórios, já que não ocorre a cura parasitológica. (LIRA *et al.*, 2006; ROMERO & BOELAERT, 2010; COURA-VITAL *et al.*, 2014; RIBEIRO, *et al.*, 2018; DOS SANTOS NOGUEIRA *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2019). Com isso, apesar de existirem medidas de controle, elas não são suficientes para diminuir o número de casos de cães infectados, não reduzindo, dessa forma, a incidência da doença no Brasil (COURA-VITAL *et al.*, 2014, GRIMALDI *et al.*, 2012; LAURENTI *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2019).

Na última década, uma diversidade de estudos buscou entender melhor os mecanismos imunológicos característicos da leishmaniose visceral canina, em busca de um novo candidato vacinal, o que poderia impactar positivamente no controle da disseminação da doença. (SILVEIRA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2014). Atualmente o Brasil possui uma vacina licenciada de segunda geração, para cães, denominada LeishTec® (FERNANDES *et al.*, 2008). Entretanto, a vacina possui limitações, como processo de obtenção da proteína A2, elevado custo, efeitos adversos, além de eficácia variável de proteção. (REGINASILVA *et al.*, 2016; MATIAS *et al.*, 2020). Assim, novos estudos que buscam antígenos para serem validados como composições vacinais contra a LVC fazem-se necessários.

Os testes sorológicos possuem vantagens em relação aos testes parasitológicos e moleculares, tais como, não necessitar de uma estrutura laboratorial laboriosa, nem de técnicos treinados, ter um custo-benefício adequado e por ser de fácil execução, com isso, atualmente

são muito utilizados para detectar a LVC (MABEY *et al.*, 2004; MENEZESSOUZA *et al.*, 2014; LAGE *et al.*, 2016; MAGALHÃES *et al.*, 2017; TRAVI *et al.*, 2018; BORJA *et al.*, 2018; SALLES *et al.*, 2019). Embora amplamente utilizados, esses testes apresentam limitações, tais como a reatividade cruzada com outras doenças, resultados falso positivos, sensibilidade e/ou especificidade variáveis, que prejudica o diagnóstico definitivo da doença principalmente em cães assintomáticos (SILVA *et al.*, 2011; VIOL *et al.*, 2012; CHÁVEZ FUMAGALLI *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2013; FRAGA *et al.*, 2016; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2017). Dessa forma, também é necessário melhorar a acurácia desses testes para que se possam traçar melhor as estratégias de controle da doença.

Devido aos problemas apresentados, diversos estudos têm sido realizados na busca por novos antígenos que possam oferecer testes sorológicos com maior sensibilidade e especificidade, e antígenos que possam ser utilizados em composições vacinais que gerem uma resposta protetora aos animais. Diversos desses estudos, têm utilizado uma metodologia de biologia molecular que avalia o conjunto de proteínas derivadas de um dado genoma de um microrganismo. A proteômica e imunoproteômica são consideradas técnicas eficientes, pois podem identificar uma gama de antígenos, com grande potencial para serem testados como vacinas e para o diagnóstico sorológico (COELHO *et al.*, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2020).

À face do exposto, e considerando o grave problema de saúde pública da LV e LVC no Brasil, fica notório a necessidade de se priorizar estudos que visam identificar novos antígenos que possam ser empregados como novas alternativas com potencial profilático e/ou imunoterápico capazes de induzirem proteção dos cães em áreas endêmicas, além de testes sorológicos para melhor manejo dos casos de LVC e conseqüentemente controle da doença em humanos. Assim, o presente trabalho visou utilizar as técnicas de proteômica e imunoproteômica, para verificar o perfil de expressão de proteínas do extrato total de formas promastigotas em fase estacionária de *Leishmania (Leishmania) infantum*, que foram obtidas através do isolamento de parasitos de cães sintomáticos e assintomáticos de uma região endêmica para a doença, com o intuito de identificar novos antígenos com possível potencial para validação como composição vacinal e em diagnóstico sorológico da LVC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leishmanioses: Etiologia e aspectos gerais

O agente etiológico causador da doença leishmaniose é um parasito pertencente ao Reino Protista (HAECKEL, 1866), a Classe Kinetoplastea (VICKERMAN, 1976), Subclasse Metakinetoplastina (VICKERMAN, 2004), Ordem Trypanosomatida (KENT, 1880), Família Trypanosomatidae (DÖFLEIN, 1901), Subfamília Leishmaniinae (MASLOV & LUKEŠ 2012), Gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A leishmaniose é uma doença obsoleta, que acometeu por muitos anos somente os animais silvestres. Acredita-se que a *Leishmania* tenha se originado durante a era Mesozóica, antes da separação do continente Gondwana (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993).

A primeira *Leishmania* descoberta foi a *Paleoleishmania proterus*, encontrada em um fóssil de um mosquito da espécie *Palaeomyia burmitis* que se alimentou de um sauropsida não ave, no período Cretáceo, 100 MYA (POINAR & POINAR, 2004). O registro mais antigo da doença em humanos foi datado em 2.500 aC, isso foi possível pelos achados em manuscritos antigos e em material arqueológico. O gênero *Leishmania* é subdividido em cinco subgêneros, sendo eles: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, *G. Enriettii* e *Paraleishmania*, mas somente os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* que parasitam mamíferos possuem importância médica (ROSS, 1903; SAF'JANOVA, 1982; LAINSON *et al.*, 1987).

Existem aproximadamente 54 espécies descritas do parasito e atualmente 31 são conhecidas por parasitar mamíferos, mas, destas somente 22 conseguem ser patogênicas para os seres humanos (HERWALDT, 1999). discernir as descritas por diversos pesquisadores como, P. Borovsky, WB Leishman e C. Donovan, durante o período de 1898 e 1901, a partir disso as convicções e métodos utilizados para discernir as espécies de *Leishmania* progrediram notavelmente, e hoje une-se técnicas moleculares e morfológicas para segregar a diversidade desses seres vivos, separando-as assim em vários complexos (WEYERS, 2016).

No Brasil existem diversas espécies de *Leishmania* capazes de causar doenças aos homens, sendo elas: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* *L. (L.) amazonensis* mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, *L. (V.) utingensis* sendo estas responsáveis por ocasionar a forma tegumentar da doença (SCHÖNIAN *et al.*, 2010; VAN DER AUWERA & DUJARDIN, 2015). E a *Leishmania (Leishmania) infantum* agente ocasionador da doença visceral (VAN DER AUWERA & DUJARDIN, 2015). Cada espécie possui a sua peculiaridade, ocasionando manifestações clínicas características, apresentando vetores específicos, reservatórios diferenciados, padrões epidemiológicos,

distribuição geográfica e até mesmo respostas terapêuticas diferentes (VALE & FURTADO, 2005).

A *Leishmania* possui um ciclo heteroxênico, possuindo dois hospedeiros, sendo um intermediário (flebotômico) e outro definitivo (mamífero e répteis) (SOLANOGALLEGO *et al.*, 2009). Mas evidências paleontológicas demonstram que antigamente quando surgiu o parasito na era Mesozóica ele detinha uma vida livre e depois passou a possuir um ciclo monoxênico, tendo como primeiro hospedeiro os mosquitos, pois não existia ainda os outros hospedeiros que pudesse parasitar (CUPOLILLO *et al.*, 2000). O parasito *leishmania* evoluiu bastante desde o seu surgimento e desenvolveu vários mecanismos de escape para se manter vivo no hospedeiro, sendo assim é importante conhecer bem a imunogenética da leishmaniose para traçar bem o desenvolvimento de vacinas e tratamentos (TEWARY *et al.*, 2004).

2.2. Epidemiologia da leishmaniose visceral

As leishmanioses até o presente momento representam uma adversidade na saúde mundial, contemplando um gradual aumento de novos casos na última década, sendo assim considerada a segunda infecção tropical de maior relevância e a quarta de maior incidência de óbito por doença parasitária (BERN *et al.*, 2008, WHO, 2020). Elas são doenças que afetam praticamente todos os continentes, e atinge principalmente regiões pobres na África, Ásia e América Latina, sendo associada à desnutrição, deslocamento da população, moradia precária, sistema imunológico debilitado e falta de recursos financeiros (GOTO & LINDOSO, 2010; PAHO, 2018).

Estima-se que 98 países e territórios são endêmicos para as leishmanioses, sendo encontradas entre as dez doenças tropicais negligenciadas mais relevantes do mundo. A doença pode ocasionar entre 50.000 e 90.000 novos casos em todo o mundo anualmente, em 2020 foram acometidos cerca de 12.838 novos casos de LV, sendo 12.739 casos autóctones e 99 importados. Destes casos, apenas 25 a 45% dos casos são relatados à OMS (WHO, 2021).

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença sistêmica que afeta principalmente crianças menores de 5 anos, podendo ser associada à desnutrição, imunossupressão, como HIV-AIDS e outras comorbidades (PAHO/WHO, 2020). A LV é um grande problema de saúde devido à sua enorme expansão geográfica, sendo que prossegue como uma das mais relevantes doenças parasitárias com surto e mortalidade (WHO, 2020) (Fig. 1). O crescimento desordenado das grandes cidades e as mudanças ambientais são fatores que contribuíram para a expansão da doença (GONTIJO & MELO, 2004; LOPES *et al.*, 2010; MANUAL, 2014).

No mundo os países que apresentam maiores casos de leishmaniose visceral são Índia, Sudão do Sul, Sudão, Brasil, Etiópia e Somália (STEVERDING, 2017). Desde o ano de 2011, o número de casos de LV relatados no mundo tem diminuído de forma consistente, uma vez que passou de 64.223 para 12.739 casos em 2020, que é o menor número desde 1998. E neste período houve um total de 3.813 óbitos relatados (WHO, 2021).

A LV é encontrada em 76 países e somente 13 são exclusivamente endêmicos para a doença e todos são encontrados nas Américas, onde 65.934 novos casos foram registrados entre 2001 e 2019, com uma média de 3.470 casos por ano. Em 2019, cerca de 97% (2.529) dos casos estavam concentrados no Brasil, entretanto, observa-se uma expansão de casos da Argentina, Bolívia, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela e Uruguai (PAHO/WHO, 2020).

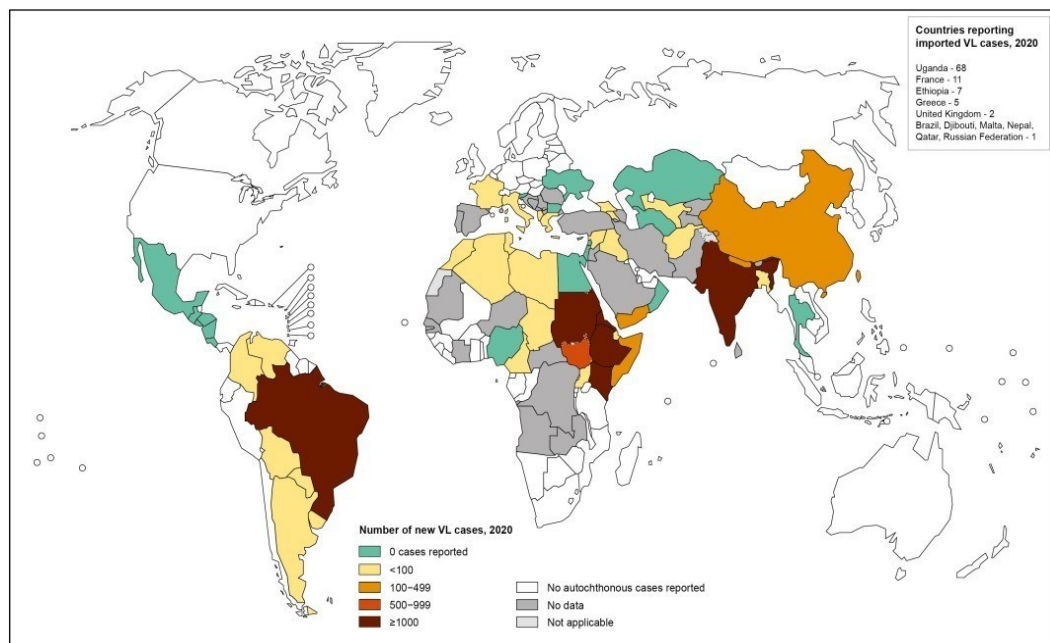
A taxa de incidência de LV nas Américas é de 2,96 e 0,47 casos por 100.000 habitantes, considerando a população da área de transmissão e a população total, respectivamente. Atualmente quatro países tiveram queda na taxa de incidência de LV, incluindo o Brasil (PAHO/WHO, 2020). De acordo com o Ministério da Saúde cerca de 4.000 casos são reportados ao ano no país (PAM, 2019).

A incidência no Brasil é em torno de 2,0 casos/100.000 habitantes e a letalidade vem aumentando com o passar do tempo, tornando-se de 3,1% em 2000 para 6,6% em 2014 (FONTES & SILVA, 2011). Entre os anos de 2003 a 2018 ocorreram mais de 51 mil casos confirmados de LV no Brasil, sendo a região nordeste a responsável pela maioria dos casos (50,1%). Porém, a região norte também apresentou alta incidência. Em 2018 registou-se 3.466 novos casos, tendo um coeficiente de incidência de 1,66 casos/ 100.000 habitantes. Sabe-se que no Brasil a doença afeta mais frequente crianças menores de 10 anos (41,9%), e com maior prevalência de casos no sexo masculino (67,2%) (PAHO, 2018).

A LVC também representa um problema de saúde, sendo bastante difundida, apresentando até 20% dos cães infectados nas localidades com grande incidência do parasito, sabe-se que a soroprevalência é alta em locais endêmicos. A LVC foi descrita pela primeira vez em 1908, na Tunísia, por Nicolle e Comte. Atualmente, está presente em aproximadamente 50 países, em grande parte na América do Sul, na região do mediterrâneo e África (DUPREY *et al.*, 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). Na América do Sul a LVC é apontada como a infecção de maior relevância zoonótica, se realçando como uma doença de alta magnitude, sendo o Brasil e Venezuela os países com maiores índices de prevalência (ABUJAMRA & MONTEIRO, 2016).

No Brasil, a dispersão da LVC entre cães possui uma relação direta com a incidência da doença no homem, pois os cães infectados servem como reservatório da leishmaniose humana (DUPREY, *et al.*, 2006; WERNECK *et al.*, 2014; SILVA, 2015). A LVC no país é de extrema relevância epidemiológica, ainda mais do que a LV humana, pois, o número de casos registrados em cães é significativamente maior em comparação ao número de casos notificados em humanos nas diversas regiões do país (NICOLATO *et al.*, 2013). A LVC exibe uma prevalência de 3 a 30% dependendo da região. Dessa maneira, as áreas endêmicas que possuem elevada transmissão, geralmente têm a ocorrência da infecção por *Leishmania* em todo o ano. (SOLANOGALLEGO *et al.*, 2001; BANETH *et al.*, 2008).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2020



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2021. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 1: Status de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo. Fonte: Organização Mundial da Saúde.

2.4. Biologia e ecologia dos flebotomíneos e ciclo biológico da *leishmania ssp.*

As leishmanioses possuem como vetor as fêmeas de flebotomíneos. São pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (GALATI, 2003). Os flebotomíneos apresentam grande relevância na saúde humana e veterinária, pois são transmissores de diversos agentes etiológicos que causam patologias graves. (BRAZIL *et al.*, 2015). Os flebotomíneos pertencentes ao Novo Mundo habitam grande área extensiva e são classificados em três grandes gêneros, sendo eles: *Lutzomyia*, *Warileya* e *Brumptomyia*. O

gênero *Lutzomyia* é considerado o de maior relevância médica, por possuir um elevado número de espécies (434) capazes de transmitir doenças. (AKHOUNDI *et al.*, 2016). As espécies *lutzomyia longipalpis* e *lutzomyia cruzi* apresentam grande relevância vetorial no Brasil, pois são capazes de transmitir o parasito *Leishmania infantum* causador da leishmaniose visceral no país (LAINSON & SHAW, 2005; FALCÃO DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O ciclo de vida do parasito *Leishmania* (fig. 2) pode iniciar-se quando um flebotomíneo fêmea realiza o repasto sanguíneo em um vertebrado mamífero infectado (NEVES *et al.*, 2011; STEVERDING, 2017). A partir do repasto sanguíneo, o flebotomíneo ingere o sangue contendo o parasito *Leishmania* em sua morfologia celular amastigota, parasitando células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) (MELO, 2004; FONSECA, 2013). Dessa forma o parasito é intracelular obrigatório e são detectados somente dentro do hospedeiro vertebrado, são formas arredondadas com flagelo rudimentar e sésseis (fig. 3). Quando o sangue ingerido atinge a porção anterior do intestino médio do inseto, os parasitos em fase amastigota começam a se transformar em formas promastigotas (fig. 3). Essas formas são encontradas somente nos hospedeiros invertebrados e possuem característica mais afilada com um flagelo funcional, sendo móveis. Dentro do intestino médio do vetor, o parasito começa a realizar a metaciclogênese, e se convertem em formas promastigotas procíclica, e iniciam a replicação para se transformarem nas formas infectantes e migratórias, conhecidas como promastigotas metacíclicas, não divisíveis (ALCOLEA *et al.*, 2010). Após atingirem a forma promastigota metacíclica o parasito migra do intestino anterior para a válvula esôfagofaríngeo-estomacal do vetor, onde permanecem até serem introduzidas na pele de um próximo hospedeiro vertebrado (FERREIRA, 2003; BASANO, 2004). Assim, uma vez infectado, o hospedeiro torna-se o depósito do agente etiológico.

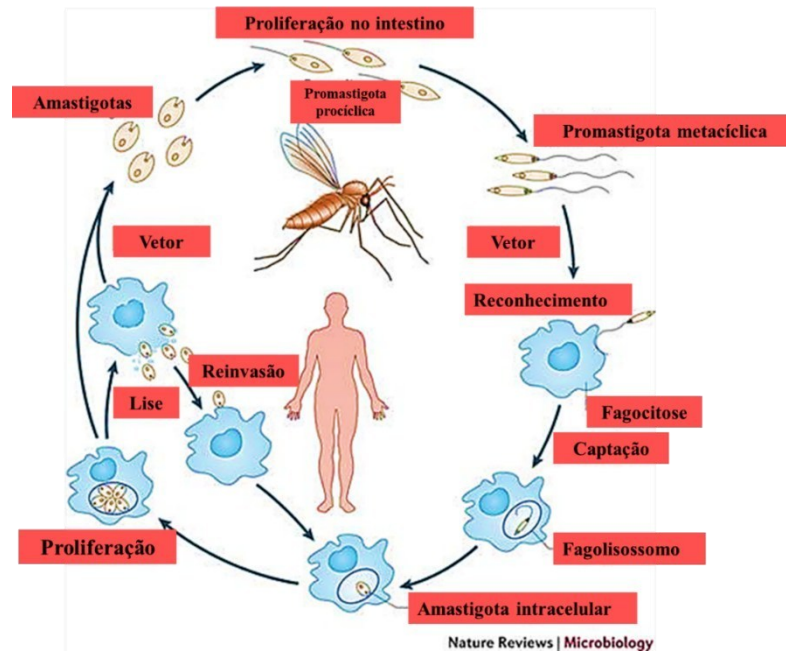


Figura 2: Ciclo de vida e transmissão da Leishmaniose. Fonte: Adaptado de Kaye & Scott (2011).

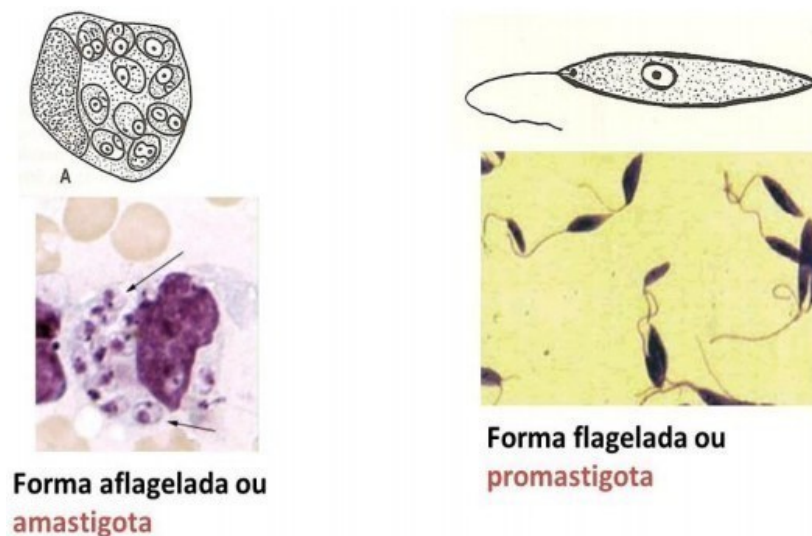


Figura 3: morfologia do parasito. (A) forma amastigota é encontrada em um formato mais arredondado e com flagelo rudimentar. (B) forma promastigota com morfologia afilada e com flagelo móvel. Fonte: Martinez (2014)

2.5. Manifestações clínicas da LV Humana e LV Canina

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa sistêmica, que é conhecida popularmente como Kalazar, os sinais clínicos apresentados nessa etapa caracterizam a forma crônica da doença e as manifestações clínicas em geral são caracterizadas perante a espécie que está infectando, a virulência da cepa do parasito, bem como, por fatores imunológicos e

genéticos do hospedeiro vertebrado (GOTO & LINDOSO, 2010). A doença pode ou não se manifestar, caso ocorra o desenvolvimento da infecção, o indivíduo passa por um período de incubação que dura em cerca de dois a oito meses após o contato com o parasito (SILVA, 2007; PACE, 2014).

A doença é definida por um vasto espectro clínico, apresentando as sintomatologias: assintomáticos, oligossintomáticos, e sintomáticos graves (GONTIJO & MELO, 2004; FIGUEIREDO, *et al.* 2014; BRASIL, 2015). Os sintomas em humanos podem iniciar com crises irregulares de febre, que permanecem por longo período, perda substancial de peso, fraqueza, com redução da força muscular, aumento do baço, do fígado, inchaço dos nódulos linfáticos, além de anemia, caracterizando a forma aguda da infecção (BAHARIA *et al.*, 2015; KHADEM VATAN *et al.*, 2016; OPAS, 2017). A doença é extremamente grave se não tratada, podendo levar o indivíduo ao óbito e esse índice é maior nos países em desenvolvimento, alcançando uma taxa de 95% (WHO, 2018). O paciente na fase crônica pode apresentar sinais clínicos mais discretos, podendo haver certo equilíbrio com o agente etiológico, mas isso não é regra, pois muitos pacientes desenvolvem a forma grave, e os sintomas apresentados podem ser definidos por emagrecimento progressivo, hepatoesplenomegalia, edema generalizado, dispneia, cefaleia e dores musculares (Fig. 4) (ASHFORD, 2000; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

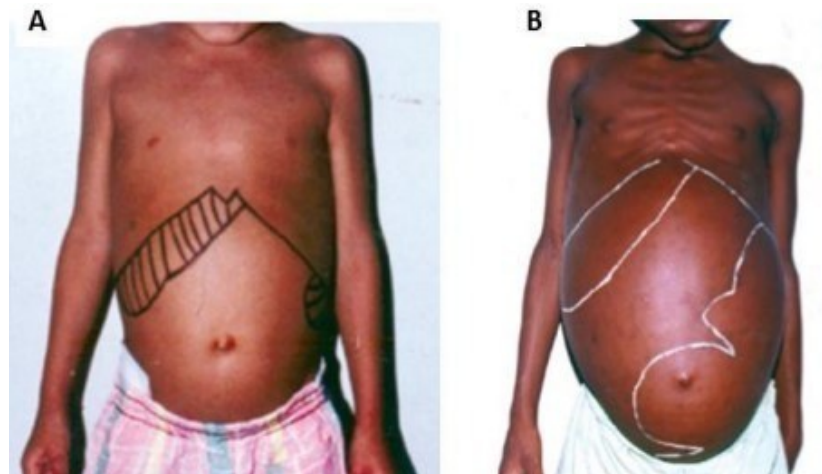


Figura 4: Manifestações clínicas da leishmaniose visceral. *A-* Manifestações clínicas na fase inicial da doença; *B-* Manifestações clínicas na fase avançada da forma visceral da doença em humanos. Fonte: Ministério da Saúde (2014)

A leishmaniose canina (LVC) pode variar os sintomas em comparação com os humanos. É uma doença caracterizada por também afetar os órgãos dos cães de forma sistêmica. As manifestações clínicas presentes nos animais podem variar de acordo com o tipo de resposta

imunológica o animal infectado vai apresentar, também perante a virulência da cepa de *L. infantum* (GOTO & LINDOSO, 2010; FONSECA, 2013; BRASIL, 2014; PAHO, 2018).

Perante os sinais clínicos dos cães, os mesmos podem ser identificados como: assintomáticos: com ausência de sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania*; cães oligossintomáticos: presença de até três sinais clínicos simultâneos, podendo ser, adenopatia linfóide, pequena perda de pelos e pelos opacos; cães sintomáticos: todos ou mais de três sintomas simultâneos entre os mais comuns da doença, distúrbios da pele e paralisia dos membros posteriores (CIARAMELLA *et al.*, 1997; MELO, 2004; OLIVA *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2009).

O quadro clínico pode variar de um animal aparentemente saudável até condições gravíssimas que podem levar ao óbito (PALTRINIERI *et al.*, 2010). A fase inicial da infecção ocorre no local da picada do vetor, posteriormente, os parasitos podem se espalhar para os órgãos e acabam também indo para a pele por possuir tropismo por essa região (DANTAS-TORRES, 2007; REIS *et al.*, 2009).

Os sinais clássicos da LVC são lesões de pele bastantes características, principalmente descamação e eczema na região nasal e do ouvido, podem também apresentar pequenas úlceras nos ouvidos, focinho, cauda e articulações, além de pelos opacos. Nos casos mais graves da doença pode ocorrer a onicogribose (crescimento das unhas atípicas), esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatite, úlceras cutâneas, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, sangramento intestinal, edema das pernas e vômitos, além de hiperqueratose (Fig. 5). No estágio mais avançado da doença o animal pode apresentar paralisia dos membros posteriores, caquexia, perda de apetite, podendo chegar ao óbito (TAFURI *et al.*, 2001; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; MELÉNDEZ-LAZO, 2018).

Além dos sinais clássicos existentes, há animais que se enquadram na categoria assintomático, podendo permanecer por longos períodos sem nenhum sinal clínico aparente, contudo permanecem com grande carga de parasitos na pele sendo um potencial reservatório, permitindo uma disseminação facilitada da doença para humanos, causando problema de saúde pública (BRASIL, 2015; WHO, 2018; VALE *et al.*, 2019).

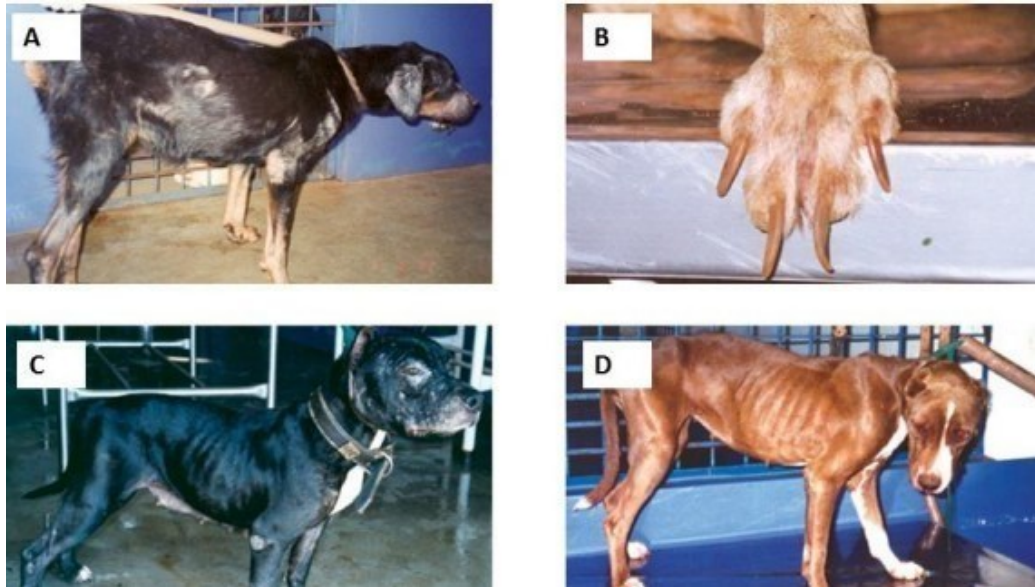


Figura 5: Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). A- Alopecia e lesões da derme do cão; B- Onicogribose no cão com LVC; C- Lesões de pele na região do focinho; D Caquexia em cão com LVC. Fonte: Ministério da Saúde (2014)

2.6. Medidas de controle

As medidas de controle empregadas atualmente são baseadas no diagnóstico clínico laboratorial da doença, tratamento dos casos humanos, uso de inseticidas nas áreas de circulação do vetor, a identificação e sacrifício de cães contaminados, e planos educativos para a população, entretanto, a eutanásia dos animais infectados é uma medida conflitante, visto que não consegue conter a propagação da doença. Nenhuma dessas medidas de contenção tem sido suficiente hoje para diminuir a propagação da doença, por esse fator o elevado número de casos de leishmaniose no mundo. (TESH, 1995; GONTIJO & MELO, 2004).

2.7. Diagnósticos da LVC

A detecção do agente causador de toda doença infecciosa é um passo determinante para o manejo clínico e/ou monitoramento da doença. Para a realização do diagnóstico da LVC, é necessária uma abordagem integrada e combinação de sinais clínicos com testes laboratoriais (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2017). Os métodos de diagnóstico direto, que demonstram a presença do parasito no cão, são considerados ideais para o diagnóstico da doença, entretanto, suas limitações podem ser compensadas por métodos indiretos baseados na resposta imunológica dos hospedeiros infectados (KAR 1995). Na leishmaniose visceral canina o diagnóstico clínico é extremamente complexo, pois o espectro de sinais clínicos é vasto, não

específico na maioria das vezes, podendo ser devido a outras patologias correlacionadas (SOLANOGALLEGO *et al.*, 2017). Além disso, muitos animais infectados apresentam-se assintomáticos por longos períodos (GONTIJO & MELO, 2004; EJAZI & ALI, 2013).

A observação das formas evolutivas do parasito é essencial para demonstrar a origem da doença, sendo considerada como o padrão-ouro para o diagnóstico das leishmanioses. Amostras obtidas de biópsias das lesões ou punções de medula óssea são empregadas para a confecção de lâminas de esfregaço e/ou para impressão em lâminas, coradas pela técnica de Giemsa que permite a identificação das formas amastigotas (DESJEUX, 2004). Quando não é possível demonstrar a presença do agente infeccioso por microscopia ou através da obtenção do cultivo, pode-se recorrer à detecção dos ácidos nucléicos dos parasitos, utilizando-se a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) (LOPEZ *et al.*, 1993; SUDARSHAN *et al.*, 2014). As vantagens dessa técnica de diagnóstico comparada a outras técnicas parasitológicas são a possibilidade de detecção do DNA de *Leishmania* com uma carga parasitária baixa, elevada especificidade, resultados rápidos, possibilidade de detecção de DNA de amastigotas e promastigotas (REITHINGER, *et al.*, 2007). Alguns problemas que podem ocorrer na realização da PCR são a possibilidade de contaminação externa, podendo gerar resultados falso-positivos, além de possuir custo elevado e necessitar de profissionais capacitados para a realização do exame. Dessa forma, os métodos parasitológicos, apesar de apresentarem especificidade elevada, possuem limitações em sua sensibilidade, pela distribuição não homogênea dos parasitos na lesão, além da coleta das amostras ser considerada invasiva (BARRAL *et al.*, 1987; WEIGLE *et al.*, 1987).

A técnica de ELISA é considerada uma ferramenta importante para o sorodiagnóstico da LV e monitoramento da exposição dos indivíduos em áreas endêmicas da doença. Geralmente, esses testes utilizam antígenos obtidos de frações brutas e/ou moléculas semi-purificadas do parasito, bem como proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos derivados deles. Outras razões para que a ELISA tenha um enorme potencial como método de diagnóstico é a possibilidade de inovações tecnológicas que melhorem sua efetividade (RODRIGUES *et al.*, 2019; OLIVEIRA-DA-SILVA *et al.*, 2020). Na LVC, cães sintomáticos produzem níveis elevados de anticorpos podendo ser facilmente detectados pelo teste, mas a sensibilidade de detecção de anticorpos em animais com infecção recente ou assintomáticos é geralmente mais fraca (CHAKRAVARTY *et al.*, 2019; VALE *et al.*, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2019). Agora, o antígeno mais utilizado no diagnóstico sorológico tem sido a proteína recombinante rk39, que vêm sendo empregada tanto para o diagnóstico, como para estudos epidemiológicos em humanos e cães, e candidato vacinal contra a LV (BURNS *et al.*, 1993; SUNDAR *et al.*, 2007).

A proteína rK39, apresenta bons resultados na triagem de animais infectados caracterizados como assintomáticos, sendo mais relevante do que quando usado para humanos com a doença na sua forma subclínica (SCALONE *et al.*, 2002; SUNDAR *et al.* 2007).

Para o diagnóstico da LVC, até o ano de 2011, era utilizado o IFAT com o intuito de confirmar os cães realmente positivos, que já passaram pela triagem de um diagnóstico feito por ELISA. Perante as limitações aparentes que a técnica IFAT apresentava em relação a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade, com o intuito de elevar a acurácia do diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde preconizou o uso do teste rápido imunocromatográfico, contendo os antígenos recombinantes rK26 e rK39, (específicos do complexo *L. donovani*, que inclui *L. infantum*) DPP® Dual-Path Platform (DPP; BioManguinhos/Fiocruz) para a triagem de cães infectados, sendo de fácil execução em campo. Entretanto é um teste que possui limitações na hora de identificar animais assintomáticos ou um com uma infecção recente (LIRA *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2010). E a técnica de ELISA, pelo kit EIE-LVC® (Bio-Manguinhos/Fiocruz), constituído de antígenos de *Leishmania majorlike*, para confirmar os resultados positivos (SILVA *et al.*, 2011; GRIMALDI *et al.*, 2012; COURA-VITAL *et al.*, 2014; BELO *et al.*, 2017). Contudo, é um teste com baixa sensibilidade e é caracterizado como qualitativo, que detecta anticorpos no soro, plasma ou sangue canino, podendo haver dificuldade em identificar animais com infecção recente. Outros testes imunocromatográficos estão disponíveis nas Américas, no entanto, eles não foram validados em larga escala.

Contudo, os testes preconizados no Brasil ainda apresentam limitações, principalmente em relação a sensibilidade, que pode ser variável nos estágios iniciais da doença e a especificidade que é prejudicada quando aplicada em animais de áreas endêmicas para leishmaniose, em animais vacinados e em cães infectados com parasitoses relacionadas como por exemplo, a babesiose, erlichiose e doença de Chagas e em animais assintomáticos (FERRER *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2011; VIOL *et al.*, 2012; GRIMALDI *et al.*, 2012; EJAZI & ALI, 2013; COURA-VITAL *et al.*, 2014). Assim, os testes disponibilizados para controle da doença apresentam limitações, sendo necessário a busca por novos antígenos para que o diagnóstico da LVC seja mais preciso, sensível, específico e de baixo custo para a população. Uma vez que os testes sorológicos atuais possuem limitações de sensibilidade e especificidade podendo ocorrer uma falha no controle, uma vez que pode suceder de eutanásia inadequada de animais saudáveis e a não identificação de casos realmente positivos que estão assintomáticos possibilitando a disseminação da doença (SINGH; SUNDAR, 2015; BELO *et al.*, 2017).

Atualmente alguns pesquisadores vêm buscando inovar os testes diagnósticos para as leishmanioses, principalmente os imunobiológicos, que são de fácil execução e de custo acessível. Os métodos tais como, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), teste de aglutinação direta (DAT), testes imunocromatográficos (TIC), entre outros estão cada vez mais visados para o investimento de melhorias (MOHEBALI *et al.* 2020).

Nestes testes, a utilização de proteínas recombinantes melhora consideravelmente a sensibilidade e a especificidade dos testes, demonstrando a relevância de se apostar nesses biomarcadores sorológicos que oferecem uma acurácia eficiente (BELO *et al.*, 2017; REZAEI *et al.* 2019;). Estudos demonstram que os antígenos que são utilizados nesses testes apresentam um comprometimento em relação a distribuição geográfica das populações estudadas bem como o ambiente que está inserido e com interferência de outras doenças, podendo ser bem variável e alterando os valores de especificidade e sensibilidade (TAKAGI *et al.* 2007; MOHAPATRA *et al.* 2010; SRIVIDYA *et al.* 2012; TÁVORA *et al.* 2015; KASSA *et al.* 2020).

Sendo assim, acreditasse que a junção de diversos antígenos seria capaz de reduzir essa heterogeneidade das respostas imunes individuais que podem ocorrer diante de cada paciente e levando a uma melhor sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da leishmaniose.

Em um estudo recente efetuado por GALVANI *et al.* (2021) foi demonstrado que quando associado vários peptídeos específicos de linfócitos B em uma construção quimérica advinda de quatro antígenos de *leishmania infantum*, o polipeptídeo recombinante foi capaz de reagir com todos os soros testados, tanto de pacientes infectados com a LV, quanto com coinfeção de LV/HIV, tendo um resultado de 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, apresentando também melhores resultados quando comparado com os mesmos peptídeos testados isoladamente. FIGUEIREDO *et al.* (2021) atestou em seu estudo que o desenvolvimento de uma proteína quimérica recombinante nomeada de DTL-4 para a avaliação de pacientes com leishmaniose visceral humana, quando utilizada no teste de ELISA apresentou valores altos de sensibilidade e especificidade, sendo de 94,6% e 99,4%, respectivamente. Recentemente SANTOS *et al.* (2020) também fizeram a construção de uma nova proteína quimérica recombinante chamada de Q5, a mesma quando utilizada para um diagnóstico a base do teste de ELISA com soro de pacientes com leishmaniose visceral canina e/ou humana apresentou valores de sensibilidade de 82,0% e especificidade de 100%. Nesta perspectiva, a importância da inovação em busca de novos biomarcadores para teste sorológicos com o intuito de modernizar os disponíveis no mercado com proteínas quiméricas feitas com epítomos específicos para linfócitos B que vão amenizar as limitações e aumentar a acurácia dos testes.

2.8. Desenvolvimento de Vacinas

No cenário mundial, o desenvolvimento das vacinas permitiu o controle e erradicação de diversas doenças. As composições vacinais possuem imunógenos (antígenos e adjuvantes) que possuem a capacidade de gerar uma resposta imunológica em um indivíduo, levando a um estado de proteção contra doenças infecciosas. Este método de prevenção quando aplicado corretamente impossibilita a transmissão do agente causador da doença para outros animais e para o homem. (FERNANDES *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2016; SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Grande parte dos indivíduos que são expostos ao parasito pode desenvolver imunidade duradoura de longo prazo, neste contexto, impulsiona as buscas para o desenvolvimento de uma vacina que proteja contra as leishmanioses (KUMAR *et al.*, 2010; SELVAPANDIYAN *et al.*, 2012).

As vacinas atuais são classificadas de primeira geração, segunda geração e terceira. As de primeira geração equivalem aos parasitos mortos ou atenuados, que podem ser obtidas através de culturas *in vitro* com meios modificados, alterações de temperatura e mutações genéticas (FOROUGHIPARVAR & HATAM, 2014). Esse tipo de vacina permite o desenvolvimento de uma resposta imunológica específica e duradoura. Entretanto, existem algumas limitações, uma vez que pode ocorrer reversão da virulência dos parasitos atenuados podendo gerar a doença no indivíduo. Atualmente já são conhecidos os genes ligados a virulência do parasito *Leishmania*, e pela técnica da engenharia genética podem ser removidos, melhorando essa limitação, contudo os organismos vivos estão sujeitos a mutações, e essa técnica é de difícil produção em larga escala (KUMAR & ENGWERDA, 2014).

As vacinas de segunda geração são constituídas por proteínas ou frações proteicas do microrganismo, sendo mais seguras. É uma vacina que precisa de um adjuvante para ativar as células do sistema imunológico e gerar uma resposta protetora (DAS & ALI, 2012). Esse tipo de vacina pode ser formulada contendo proteínas recombinantes purificadas ou peptídeos sintéticos em formas de quimera. Existem também as vacinas de terceira geração, como as desenvolvidas de DNA e RNA (NOAZIN *et al.*, 2008; MUTISO *et al.*, 2013).

Para o desenvolvimento de uma vacina visando os métodos convencionais leva, em média, de 10 a 15 anos, sendo um tempo extenso de pesquisa e que muitas vezes a vacina ainda não chega ao mercado (RAPPUOLI, 2001; HOMMA *et al.*, 2003). Até o presente momento existem no mundo apenas três vacinas licenciadas contra a leishmaniose visceral canina. Sendo uma advinda do Brasil e as outras duas da Europa, Leish-Tec® (HertapeCalier, Brasil), Canileish® (Virbac, França) e Letifend® (Laboratórios Leti, Espanha) respectivamente (PALATINIK-DE-SOUSA, 2019).

A vacina disponibilizada no Brasil é a Leish-Tec®, ela foi elaborada a partir da proteína recombinante A2 específica de formas amastigotas de *Leishmania denovani* e possui a saponina como adjuvante (FERNANDES *et al.*, 2008). Em um estudo foi demonstrado que essa vacina é apta para proteger os animais cerca 71,4%, isso quando comparados com grupos de animais não imunizados, mas quando observado somente o grupo de animais imunizados a mesma gera mais de 90% de proteção. (REGINA-SILVA *et al.*, 2016).

Com isso os cães que são vacinados com Leish-Tec®, apresentam elevação dos níveis séricos de IFN γ e redução dos níveis de IL-10 (FERNANDES *et al.*, 2008; REGINA-SILVA *et al.*, 2016). Estudos demonstram que os animais após imunizados com a Leish-Tec®, apresentam uma resposta imune celular eficiente, com ativação de células T, indução de liberação de IFN e ativação de macrófagos com produção de óxido nítrico e consequente proteção contra a infecção (COELHO *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2008). Além da resposta celular, animais imunizados apresentam uma resposta humoral, com aumento dos níveis de imunoglobulina IgG total e IgG2a específicas contra o antígeno, indicando um perfil de resistência à infecção (FERNANDES *et al.*, 2008; TESTASICCA *et al.*, 2014; SILVA, 2015).

Contudo, o Ministério da Saúde não preconiza o uso dessa vacina para controle e prevenção da LVC. Sendo assim, é uma vacina paga, disponível somente em clínicas veterinárias particulares (BRASIL, 2014). Além disso, apesar de se tratar de uma vacina relativamente eficiente, diversos efeitos adversos foram descritos como reações de hipersensibilidade, manifestações no local da aplicação, tais como: dor, nódulo, edema, alteração da coloração da pelagem, alopecia e alterações sistêmicas como apatia/ prostração, febre, êmese, diarreia, angioedema ou até anafilaxia (MATIAS *et al.*, 2020).

A caniLeish® é uma vacina de proteína recombinante licenciada na França desde o ano de 2011. Essa vacina contém em sua formulação antígenos purificados de promastigotas de *leishmania infantum* e possuem como *adjuvante* uma fração altamente purificada de Quillaja saponaria para reforçar a resposta imunitária contra o parasito (MORENO *et al.*, 2012). Ela consegue induzir uma resposta eficiente para leishmaniose com polarização de células Th1 e com liberação de anticorpos IgG1 e IgG2 que podem ficar por meses detectáveis no organismo após a administração, sendo ideal quando se trata de ser efetiva contra a leishmaniose. Cães vacinados com CaniLeish podem desenvolver resposta imune do tipo Th1 dentro de 3 semanas (GRADONI, 2015; VIANA *et al.*, 2016; STARITA *et al.*, 2016). Entretanto a caniLeish® possui também algumas limitações tais como, a sororeatividade, que pode ocorrer devido à infecção natural dos cães ou devido à imunoprofilaxia, não se sabe ao certo o pode causar essa reatividade cruzada (OLIVA *et al.*, 2014; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2017).

A vacina LetiFend® é concedida da Europa e está no mercado desde o ano de 2016, ela também é licenciada para o uso veterinário. É utilizada em cães para os prevenir a infecção pelo parasito *Leishmania infantum* e evitar assim a transmissão da doença aos seres humanos. A vacina Letifend é constituída por uma proteína quimérica que contém a substância ativa da proteína Q, é formada por cinco fragmentos antigênicos de quatro diferentes proteínas de *L. infantum* (proteínas ribossômicas LiP2a, LiP2b e LiP0 e a histona H2A), ao qual nenhum adjuvante é adicionado (EUROPEAN, 2016). Em um estudo de campo a vacina demonstrou uma eficácia de cerca de 72% na prevenção de sinais clínicos de leishmaniose canina (CanL) e conseguiu reduzir a probabilidade de casos de CanL confirmados ou desenvolvimento de sinais clínicos em cães vacinados quando comparados com cães controle em cinco e 9,8 vezes, respectivamente (REGUERA *et al.*, 2016).

Os fabricantes das vacinas disponibilizadas no mercado contra o CanL sempre preconizam a utilização simultânea de inseticidas tópicos, ou coleiras repelentes em animais imunizados, uma vez que os níveis de proteção atribuídos apenas pela vacinação não são suficientemente satisfatórios na hora de prevenir a infecção causada pelo parasito *L. infantum*. Além do mais, os cães que são vacinados e posteriormente infectados podem ainda representar possíveis fontes reservatórios do parasito, uma vez que em alguns casos a utilização da vacina nos animais podem apenas reduzir os sinais clínicos dos indivíduos infectados, afetando realmente a infecção do cão e isso seria extremamente prejudicial para o controle da doença até em humanos (BONGIORNO *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2014; MIRÓ *et al.*, 2017).

Nesse sentido, é necessário à validação de novos candidatos vacinais capazes de gerar respostas específicas e de memória, que causam menos efeitos adversos além de apresentarem uma proteção maior. O Intuito de lançar uma nova vacina no mercado auxiliaria de forma eficiente para conter a doença e diminuir o número de casos em cães e conseqüentemente em humanos (DUARTE *et al.*, 2016; SRIVASTAVA *et al.*, 2016)

2.9. Proteômica e imunoproteômica

A proteômica é caracterizada como o estudo que busca de forma sistemática identificar e caracterizar o complexo protéico que constitui uma matriz biológica que é produzida e definida em um determinado momento sob certas condições. Trata-se de uma ferramenta promissora que analisa o produto do genoma. Com a proteômica é possível avaliar níveis de expressão de proteínas, as modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e apontar biomarcadores para sorodiagnóstico e vacina. (HAYNES & YATES, 2000; COELHO *et al.*,

2016; DUARTE *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2020).

A análise proteômica inicia-se com a confecção dos géis bidimensionais (2-DE). A etapa principal é a preparação das amostras, que deve conter o tampão e a etapa de solubilização. Posteriormente é realizado o processo de focalização isoeletrica (IEF), onde as proteínas presentes nas *strips* migram em um gradiente de pH e interrompem quando atingem seu ponto isoeletrico (PI), sendo a primeira dimensão. Logo após esse processo realiza-se o equilíbrio e por fim, a segunda dimensão através da eletroforese em SDS-PAGE, que é a fase em que ocorre a separação das proteínas por peso molecular (PM) (TUSZYNSKI *et al.* 1979; NAKAMURA *et al.* 1992). Já a imunoproteômica é um método que combina a técnica de proteômica com dados imunológicos (STEEL *et al.*, 2005). A aplicação de tecnologias como Western-Blotting e espectrometria de massas concede o reconhecimento de diversas proteínas, incluindo aquelas, não descritas na literatura. Apesar de várias técnicas terem sido desenvolvidas, a tecnologia tradicional de eletroforese 2-DE ainda se encontra bastante utilizada para estudos de proteômica (PEACOCK *et al.* 2007; REAL *et al.* 2013).

Diversos estudos que classificaram a expressão de proteínas de *Leishmania spp.* foram baseados em metodologias de proteômica, o beneficiou de forma relevante para descrever as suas respectivas funções. A partir dessa técnica foi possível conceder a identificação dos genes que estavam relacionados à virulência do parasito, proporcionar também a avaliação do mecanismo de resistência contra diversos fármacos, além de facilitar o entendimento da relação parasito hospedeiro e auxiliar na identificação de proteínas que estão associadas com a regulação da doença (GOPFERT *et al.* 1999; DRUMMELSMITH *et al.* 2003; COELHO *et al.* 2012; MATRANGOLO *et al.* 2013; BROTHERTON *et al.* 2014; MAGALHÃES *et al.* 2014; DA SILVASANTOS *et al.* 2015).

Alguns estudos voltados para a proteoma *Leishmania ssp.* foram realizados no intuito de comparar os diferentes estágios do ciclo de vida (EL FAKHRY *et al.*, 2002; AVILA *et al.*, 2003; GONGORA *et al.*, 2003; PALATNIK-DE-SOUSA, 2008). Estudos recentes empregando a imunoproteômica permitiram também a identificação de antígenos já conhecidos, além de muitas proteínas hipotéticas que, em conjunto, representam importante contribuição para o diagnóstico da LVC, além de proteínas com potencial para o emprego em vacina contra a *L. infantum* (COELHO *et al.* 2012; CHAVÉZ-FUMAGALLI *et al.* 2013; MARTINS *et al.* 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2020).

Diante das limitações apresentadas para o sorodiagnóstico da LVC e nos imunógenos utilizados atualmente, o presente estudo propôs identificar, por meio das técnicas de eletroforese bidimensional, immunoblotting e espectrometria de massas novos antígenos da espécie *Leishmania infantum*. Na estratégia empregada, foram utilizados parasitos no estágio de promastigota, isolados de cepas de *L. infantum* de cães sintomático e assintomático de uma região endêmica para LVC no estado de Minas Gerais, com o intuito de identificar biomarcadores mais sensíveis que possam ser empregados no diagnóstico sorológico também como candidatos vacinais para a LVC. Com o objetivo de construir duas proteínas quiméricas, foi realizado a predição de epítopos de linfócitos B e T de cinco proteínas hipotéticas identificadas a partir da proteômica deste estudo para futuramente serem empregues em futuros estudos como candidatos vacinais e marcadores sorológicos da leishmaniose visceral canina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil proteômico de cepas de *Leishmania (Leishmania) infantum* isoladas de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados de uma região endêmica para a leishmaniose visceral canina, com a finalidade de identificar novos biomarcadores para o diagnóstico sorológico e para o desenvolvimento de composições vacinais para a leishmaniose visceral canina.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar o perfil proteômico dos parasitos de *L. (L.) infantum* isolados de cães assintomáticos e sintomáticos nas formas promastigotas;
- Utilizar soros de cães com leishmaniose visceral (LV) assintomáticos ou sintomáticos, de cães saudáveis de área endêmica, cães com doenças correlacionadas (babesiose e erliquiose), e cães vacinados para a pesquisa das proteínas, que sejam reconhecidas por experimentos de imunoproteômica;
- Identificar e caracterizar as proteínas reconhecidas pelos anticorpos presentes nos soros de cães com LV sintomático, assintomático e vacinados, utilizando espectrometria de massas.
- Identificar os epítomos de linfócitos B e T das proteínas identificadas, para seleção dos melhores alvos para vacina e marcadores sorológicos da leishmaniose visceral canina.
- Construir proteínas quiméricas com os epítomos de linfócitos B ou T das proteínas identificadas para serem utilizados como candidatos vacinais e marcadores sorológicos da leishmaniose visceral canina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitos

No presente estudo foram utilizadas seis amostras de cepas de *L. infantum* oriundas de isolamento de medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* provenientes de área endêmica do estado de Minas Gerais (Governador Valadares). Os cães foram classificados como assintomáticos, quando apresentaram no máximo um sinal clínico (linfonodo poplíteo com discreto aumento) e sintomáticos com mais de 3 sinais clínicos sugestivos para infecção de leishmaniose visceral canina (LVC) perante o exame físico (emagrecimento, linfadenopatia generalizada, dermatite, alopecia, perda de pelo).

Todos os animais apresentaram resultados positivos nos testes sorológicos de RIFI e ELISA além do teste rápido imunocromatográfico DPP® (BioManguinhos®). Associados aos testes sorológicos, os animais apresentaram exames parasitológicos positivos pela cultura em NNN/LIT ou PCR em tempo real realizado em aspirado de medula óssea. De maneira complementar, testes bioquímicos foram efetuados, sendo executados o de creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubina, onde os animais assintomáticos apresentavam valores de referência e os cães sintomáticos possuíam valores de referência acima.

Os cães integrantes deste estudo foram inteiramente animais domésticos. E as amostras utilizadas foram advindas de um projeto em colaboração com o pesquisador Bruno Mendes Roatt, que foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA / UFOP), sob o número de protocolo nº 2010/57.8.

A punções aspirativas na medula óssea para isolamento dos parasitos e diagnóstico, foi executada diante dos animais submetidos à anestesia geral, obedecendo ao protocolo anestésico, com uma combinação de cloridrato de xilazina (Calmium®), como medicação pré-anestésica, na dose de 2,0 mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular de cloridrato de cetamina (KetaminaAgener®,) na dose de 11,0 mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular, como anestésico geral. Após a obtenção do estado de anestesia geral, foi realizada a tricotomia e a antissepsia com solução de álcool iodado 2,0% (Rialcool®) na região do esterno. A punção de medula foi efetivada com uma agulha de 18G (1,25 mm x 38,0 mm) (Nipro Agulha Hipodérmica, Nipro Medical, Brasil) acoplada em uma seringa de 10,0 ml (BD Plastipak®, Becton, Dickisonand Company, EUA). Logo em seguida da introdução da agulha no osso esterno, a mesma foi adentrada até atingir o canal medular, com isso foi exercida uma pressão negativa no êmbolo da seringa e coletada uma amostra de 1,0 ml de substância da medula óssea (RASKIN & BELDNER, 1998). Aproximadamente 0,75 ml do material procedente da medula

foram transferidas para um tubo autoclavado de microcentrífuga de 2,0 ml (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha) e para o diagnóstico parasitológico PCR em tempo real foi utilizado 0,25 ml, que posteriormente foi transferido para dois tubos contendo NNN/LIT a fim de se isolar o parasito. Após o isolamento, os parasitos foram cultivados em meio Schneider (SIGMA) completo, o qual foi constituído pelo meio Schneider's (SIGMA) acrescido com 20,0 % de soro fetal bovino (SIGMA) inativado, 20,0 miliMolar (mM) de L-glutamina, 50,0 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) de gentamicina, 200,0 unidades por ml de penicilina e 100,0 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, em pH 7,4 e a 24,0 °C. Foi utilizado um *pool* de três isolados de cada classificação (sintomático e assintomático). O cultivo dos parasitos, e a obtenção das formas promastigotas em fase estacionária, além do preparo dos extratos totais dos parasitos foram realizados seguindo os protocolos descritos por COELHO *et al.* (2003).

4.2. Amostras de Soro

Foram utilizadas amostras de soros de cães possuindo a leishmaniose visceral canina. Os soros de animais positivos para infecção de LVC foram eleitos com base nos testes sorológicos da Bio Manguinhos (Fiocruz, Brasil): RIFI (IFAT-LVC BioManguinhos kit) e ELISA (EIE- LVC Bio-Manguinhos kit) e pelo teste de PCR. Os soros que apresentavam um título $< 1/40$ no RIFI e que fossem identificados abaixo do valor do ponto de corte indicado pelo fabricante foram considerados negativos. E os animais com título de RIFI $> 1/40$ e valor de absorbância acima do ponto de corte foram considerados positivos.

Para a realização dos experimentos de Western Blotting, foram utilizados um *pool* de diferentes amostras de soros de animais com LV considerados sintomáticos (n=23) perante os resultados positivos nos testes RIFI, ELISA e PCR, além de possuir três ou mais sinais clínicos da doença, como perda de peso, alopecia, adenopatia, onicogribose, hepatomegalia, conjuntivite e dermatite esfoliativa no focinho, cauda ou pontas das orelhas. Bem como um *pool* de animais assintomáticos (n=6) que também apresentaram resultados parasitológicos e sorológicos positivos e ausência de sinais clínicos da doença.

Para a avaliação da reatividade cruzada dos antígenos nos experimentos de immunoblotting, os soros pertencentes aos animais saudáveis de área endêmica (n=20) (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) para as leishmanioses que apresentaram resultados sorológicos, moleculares e clínicos negativos, amostras de soros experimentalmente infectados com *Ehrlichia canis* (n=21) e *Babesia canis* (n=12) e amostras de soros de animais saudáveis de um canil que foram imunizados com a vacina Leish-Tec® (n=21) foram aplicadas nos ensaios. Todos os soros presentes no estudo fazem parte de um projeto aprovado pelo Comitê

de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA/ UFOP), sob o número de protocolo 52/2014 em colaboração com o professor Dr. Bruno Mendes Roatt. Os *pools* de soros foram obtidos através da combinação de alíquotas iguais derivadas de amostras de soro de cada indivíduo, seguindo um modelo previamente descrito (LANYON, 2014), no qual se torna possível a confecção de *pools* com um tamanho amostral variando de 6 a 23 soros.

4.3. Eletroforese Bidimensional

4.3.1. Preparação dos extratos protéicos de *Leishmania infantum*.

Para a preparação e obtenção do extrato total das formas promastigotas em fases estacionárias de *L. infantum*, bem como os géis bidimensionais, foram realizados utilizando os protocolos modificados de COELHO *et al.* (2012) e MAGALHÃES *et al.*, (2014).

Os parasitos (4×10^8 células) foram ressuspensos na solução de reidratação DeStreak (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) que contém inibidores de fosfatases (5,0 mM de fluoreto de sódio, 2,0 mM ortovanadato de sódio, e 50,0mM de sódio β -g) e solução de inibidores de proteases (Protease Inhibitor Cocktail, GE Healthcare; 1,0 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, SigmaAldrich). Após a homogeneização das amostras, a ruptura das células foi realizada em um sonicador com imersão em banho de gelo, por 30 segundos com amplitude de 40 MHz, repetindo esse processo por 9 vezes. As amostras foram centrifugadas a 11.000,0 rpm por 8 min, a 4,0°C. O sobrenadante do extrato total foi coletado e o precipitado descartado, posteriormente a concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras foram congeladas a -80,0 °C, até o momento do uso.

4.3.2. Migração em primeira dimensão - Isoeletrofocalização (IEF)

Essa primeira fase foi praticada em géis com gradientes de pH imobilizados sobre strips (finas fitas de plástico) (ImmobilineDryStripsGels; GE Healthcare Life Sciences) de tamanho constante (7,0 cm), com o intervalo de pH pré-determinado não linear (4-7) utilizando-se o aparelho Ettan IPGphor 3 systems (GE Healthcare Life Sciences) que permite a aplicação de alta voltagem.

4.3.2.1. Preparo das amostras

As amostras ficaram sob agitação durante 30 minutos em agitador rotatório a 20,0 x g para completo descongelamento. Posteriormente, 250,0 μ g das mesmas foram agitadas em vortex e diluídas em: 125,0 μ l de tampão IEF (isoeletrofocalização), 10,0 mg/ml de DTE

(ditioeritritol) e 1,0% (1,25 μ l) de tampão IPG/ (gradiente de pH imobilizado) para as strips de 7,0 cm.

4.3.2.2. Reidratação das strips

Logo após o preparo, as amostras foram pipetadas no centro dos sarcófagos em volume final de 125,0 μ l. As strips foram posicionadas sobre as amostras, sendo o gel colocado em contato com as proteínas. Após 10 minutos de repouso, o óleo mineral (Fluid Cover GE, Healthcare Life Sciences) foi adicionado para evitar a evaporação da amostra e a cristalização da ureia. A reidratação passiva (sem corrente) ocorreu por 18 horas, à temperatura ambiente.

4.3.2.3. Isoeletrofocalização

Após a hidratação do gel, a isoeletrofocalização foi realizada utilizando o equipamento Ettan IPGphor 3 systems, a 1.000 V por 300 V/h; 5.000 V por 4.800 V/h; e mantendo a 5.000 V por 3.000 V/h.

4.3.3. Equilíbrio das strips

O equilíbrio foi executado antes da colocação das strips sobre o gel de segunda dimensão. Nesta fase o gel já estava pronto. Após a focalização, cada strip foi incubada por 15 min em uma solução contendo 50,0 mM de Tris-HCl, pH 8,8; 6,0 M de uréia,

30,0% (v/v) da concentração final de glicerol, 2,0% (p/v) de SDS, 0.002% de azul de bromofenol, e 1,0% (p/v) de DTT; seguido de uma segunda incubação com a mesma solução utilizando 125,0 mM de iodoacetamida no lugar do DTT.

4.3.4. Migração em segunda dimensão – GEL SDS-PAGE

Após o equilíbrio, as strips foram transferidas para um gel 12,0% de poliacrilamida e seladas com solução contendo agarose, tendo sido utilizado o padrão de peso molecular de proteínas (BenchMark™ ProteinLadder, Invitrogen). A eletroforese foi elaborada utilizando um tampão de corrida (25,0 mM de Tris-HCl, 192,0 mM de glicina e 0,1% de SDS, em pH 8,3), sob voltagem constante de 30,0 mA/gel. O sistema utilizado para a eletroforese foi o Mini-Protean II system (Bio Rad) conectado ao MultiTemp II cooling bath (Amersham Biosciences).

Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie colloidal Brilliant Blue G250 (NEUHOFF *et al.*, 1988). E as imagens dos géis foram documentadas usando o scanner

Typhoon (GE HeaLThcare) e as análises foram executadas utilizando o software PDQuest™ (BioRad). Após a elaboração de quatro preparações proteicas a comparação dos perfis dos géis bidimensionais foi analisada de forma independente.

4.4. Western Blotting e análise dos spots

Para a efetivação dos experimentos de Western Blotting foram utilizadas amostras de soros de cães com leishmaniose classificados como sintomáticos (CLVS), assintomáticos (CLVA), que possuíam babesiose (CBab), erliquiose (CErI), cães saudáveis de áreas endêmicas (CT) e cães vacinados (CV). Para essa análise, os extratos totais de formas promastigotas de *L. infantum* advindas de animais sintomáticos e assintomático foram separados por géis 2-DE e transferidos para membranas de nitrocelulose (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), em tampão de transferência por 2 horas, a 400,0 mA. As membranas foram bloqueadas com 5,0% (p/v) de leite em pó desnatado (Molico®), diluído em 10,0 ml de solução TBS-T (20,0 mM de Tris, 200,0 mM de NaCl e 0,05% de Tween 20), por 2 horas e à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas cinco vezes (10 minutos cada lavagem) com uma solução de PBS-T e incubadas com os *pools* de soros de CLVS, CLVA, CBab, CErI, CT e CV que foram agrupadas em diferentes *pools*. As amostras foram diluídas para 1:200 em PBS-T a 2,0% (p/v) em leite em pó desnatado (Molico®), e uma incubação foi processada por 2h, à temperatura ambiente. Após, as membranas foram lavadas cinco vezes (10 minutos cada) com PBS-T e incubadas com conjugado anti-IgG de cão ligado a peroxidase (1:10000, diluído em PBS-T) por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente as membranas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e a revelação dos spots reativos foi desenvolvida utilizando o reagente ECLTM

Western Blotting Detection e o ImageQuant LAS 4000 device (GE Healthcare). E os géis 2-DE foram corados com Comassie Brillhante G-250, conforme descrito (NEUHOFF *et al.*, 1988). Para sua análise, os géis foram escaneados utilizando o ImageScanner III (GE Healthcare) e os spots que foram reconhecidos apenas pelos soros de CLVS ou CLVA foram extraídos manualmente para a posterior identificação das proteínas. Os géis 2-DE e os immunoblots foram realizados em quadruplicata.

4.5. Digestão trípica, extração dos peptídeos e espectrometria de massas

Os spots selecionados foram excitados manualmente do gel, e os fragmentos foram descorados com uma solução contendo 50,0% de metanol e 2,5% de ácido acético. As proteínas foram reduzidas com 10,0 mM de DTT e alquiladas com solução de 50,0 mM de iodoacetamida. Após a desidratação, os fragmentos foram incubados com 50,0 µL de solução de protease (20,0

ng/ml de tripsina em 25,0 mM bicarbonato de amônio; Promega, USA), por 30 min e em banho de gelo. O excesso da solução de proteases foi removido e trocado por solução de 25,0 mM de bicarbonato de amônio. A digestão foi realizada por 18 horas e a 37,0°C. A extração dos peptídeos foi realizada três vezes por 15 minutos utilizando 30,0 mL de uma solução composta por 50,0% de acetonitrila e 5,0% de ácido fórmico. O material foi concentrado em Speed-Vac (Savant, USA), e submetido à análise no LC-MS/MS. A análise foi realizada utilizando um espectrômetro de massas do tipo Electrospray Ion-Trap Time of Flight (ESI-IT-TOF, Shimadzu Co., Japan), acoplado a um sistema binário ultrarrápido de cromatografia líquida (UFLC, 20A Prominence, Shimadzu Co., Japan). As alíquotas foram passadas em uma coluna C18 (Discovery, 2.2 µm; 100,0 mm x 3,0 mm), que foi diluída em um sistema binário de solventes, composto por (A) água/ácido fórmico (Ácido fórmico, 999/1, v/v) e (B) acetonitrila/água/ácido fórmico (900/99/1, v/v/v). A coluna foi eluída em um fluxo constante de 0,2 ml/min, com um gradiente de 5,0 a 60,0% de solvente B, ao longo de 40 min. Os eluatos foram monitorados utilizando um detector SPD M20A (Shimadzu) antes de serem introduzidos no espectrômetro de massas, em que a tensão de pulverização foi mantida a 4,5 KV, e a voltagem capilar em 1,76 KV, a 200,0 °C. Os espectros de massas foram obtidos no modo positivo e recolhidos na faixa de 80 a 1.850 m/z. Os espectros MS/MS foram adquiridos de acordo com os parâmetros de aquisição dependente de dados. Instrumentos de controle, aquisição e processamento de dados foram realizados usando soluções próprias (versão LCMS solution 3.60.361, Shimadzu), incluindo a geração de MGFs.

4.6. Identificação das proteínas e pesquisa em banco de dados

Os arquivos provenientes do MGF gerados pelo software Protein Post Run Analyses (Shimadzu Co., Japan) foram analisados pelos programas Mascot Server v. 2.4 e Peaks Studio v. 7, contra um banco de dados personalizado que consistiu em todas as entradas UniProt do gênero *Leishmania spp.* Os parâmetros utilizados na busca foram: uma clivagem perdida, tolerância de massa de 0,2 Da, modificações fixa de carbamidomethyl cisteína e modificações variáveis de metionina oxidada. Os resultados apresentados são da análise In Chorus Peaks Studio, que combinam os resultados dos programas Mascot e Peaks.

4.7. Predição de epítomos das proteínas de *Leishmania*

Para obter as sequências peptídicas de cada proteína realizamos a busca utilizando o nome da proteína no banco de dados online GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e SwissProt (<https://www.ebi.ac.uk/uniprot/>). Em seguida, utilizamos o programa de

bioinformática Blast-p (*protein-protein BLAST*), que pertence ao programa BLAST para comparação de similaridades entre sequências proteicas, para avaliar a similaridade das proteínas com as demais proteínas depositadas no banco de dados. Para isso, foi inserido a sequência de aminoácidos obtida pelos bancos de dados para cada proteína analisada, utilizando o parâmetro *nonredundant protein sequences*, obtendo-se então as sequências com maiores similaridades. Após a busca foram selecionadas as proteínas de *Leishmania* que apresentaram maior similaridade, e analisadas as *Leptomonas* e *Trypanosoma* para observar se havia alguma similaridade. As sequências das proteínas de *Leishmania* analisadas foram submetidas ao programa ABC pred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) capaz de predizer epítomos lineares de célula B baseando-se em padrões de comprimento fixo através de uma rede neural artificial (Saha e Raghava, 2006). Neste programa utilizou-se os seguintes parâmetros: *Threshold: 0.85; Window Length Used for prediction: 14 ou 16; Overlapping Filter: ON*. Sendo realizada a predição dos possíveis epítomos para cada uma das 5 proteínas analisadas.

Ao predizer os possíveis epítomos das proteínas as sequências proteicas foram alinhadas através do programa Clustal Omega. Este programa faz o alinhamento de múltiplas sequências, sendo assim as proteínas de *Leishmania* foram alinhadas e analisadas a similaridade com outras proteínas do mesmo gênero do parasito e com proteínas do gênero *Trypanosoma* e *Leptomonas* identificadas no Blast-P. Assim foram comparadas as regiões epitópicas das sequências analisadas com as sequências similares obtidas através do Blast-p, tanto com as proteínas de *Leishmania* quanto as de proteínas de *Trypanosoma* e *Leptomonas*.

Para confirmação da predição dos possíveis epítomos também utilizamos o programa de bioinformática IEDB (www.iedb.org) descrito por EMINI, *et al.* (1985). Este programa possui uma série de algoritmos voltados para predição de epítomos de células B e de células T. Utilizamos o algoritmo *Emini Surface Accessibility Prediction*, que identifica na sequência da proteína, os resíduos de aminoácidos mais acessíveis ao solvente, sendo assim os aminoácidos que possivelmente possam ser reconhecidos por anticorpos (EMINI, *et al.*, 1985).

Para a seleção das proteínas hipotéticas de interesse a serem utilizadas como candidatos vacinais, a presença de epítomos específicos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nas sequências das mesmas foi avaliada, com base na sua capacidade em estimular o desenvolvimento de uma resposta imune celular nos hospedeiros mamíferos. A24 e B7 para células T CD8⁺ (MHC-I) de humanos e os alelos H-2Db, H2Dd, H-2Kb, H-2Kd, H-2Kk e H-2Ld para células T CD8⁺ (MHC-I) de camundongos. Da mesma forma, foram selecionados os alelos HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR8, HLADR9, HLADR11, HLA-DR12, HLA-DR13 e HLA-DR15 para células TCD4⁺ (MHCII) de humanos e os alelos H-2IAb, H-

2IAd, H-2IAs, H-2IEd e H-2IEb para células T CD4⁺ (MHC-II) de camundongos (DIAS *et al.*, 2018). Após, para o parâmetro "Binding Threshold" utilizou-se percentage 2% para o MHC-I e 5% para o MHC-II, e em "Proteasome Cleavage" utilizou-se filter off. Em consequente, clicou-se em send e as sequências selecionadas foram aquelas que apresentaram as maiores porcentagens de predição.

Para predizer epítomos que não possuem aminoácidos com resposta a linfócitos B, realizamos a predição de epítomos de células B das proteínas através do programa de bioinformática Bepipred 1.0 (LARSEN *et al.*, 2006).

4.8. Construção da proteína quimérica

Para o desenho da proteína quimérica as sequências de aminoácidos de cada epítomo foram traduzidas para sequência de códons de DNA correspondente, utilizando o Mapa do Código Genético Padrão (STRYER *et al.*, 2004). Após a conversão, as sequências foram agrupadas linearmente com espaçamento de duas glicinas entre cada peptídeo, de forma a formar uma única proteína com diferentes epítomos. A disposição de cada um dos epítomos dentro da proteína quimérica foi escolhida de forma a mimetizar a disposição desses em sua proteína de origem. Utilizamos o servidor PepCalc (www.pepcalc.com) a fim de avaliar a solubilidade da quimera. Foi adicionada a sequência da proteína, de modo que através de uma calculadora virtual para propriedades físico-químicas de sequências primárias de proteínas, foi calculada a solubilidade da proteína.

5. RESULTADOS

5.1. Análise dos mapas proteômicos dos extratos de *L. infantum* de cães sintomáticos e assintomáticos identificados nos géis 2D e Western Blotting

Para realização dos géis bidimensionais utilizados neste estudo, inicialmente preparou-se as amostras de proteínas de parasitos de *L. infantum*. As amostras foram obtidas a partir de parasitos isolados de cães naturalmente infectados de uma região endêmica do estado de Minas Gerais na cidade de Governador Valadares.

Os cães utilizados no trabalho eram cães domésticos e não apresentavam qualquer outro tipo de infecção. Ao todo foram incluídas 06 amostras de cepas de *L. infantum* oriundas do isolamento da medula óssea. Os cães foram separados em assintomáticos, com presença de no máximo um sinal clínico e sintomáticos com mais de 3 sinais clínicos sugestivos de LVC no exame físico. Também foram realizados testes sorológicos de imunofluorescência indireta (RIFI), imunoenzimático (ELISA) e teste rápido imunocromatográfico DPP® (Bio-Manguinhos®), sendo que todos os animais apresentaram resultado positivo. Associados aos testes sorológicos, os animais apresentaram exames parasitológicos positivos pela cultura em NNN/LIT ou PCR em tempo real realizado em aspirado de medula óssea. Foram utilizados 03 isolados de cada classificação (sintomático e assintomático), e foi realizado um *pool* com as 03 amostras de cada classificação para os géis 2D.

Nos mapas proteômicos dos géis 2D, obtidos neste estudo a partir dos extratos totais de formas promastigotas axênicas do parasito *Leishmania infantum* presente em cães apontados como sintomáticos foi possível constatar a presença de cerca de 200 *spots* (Fig. 6), sendo que a grande parte dos *spots* identificados estão localizados entre a faixa de 10 a 60 KDa.

Nas análises realizadas dos extratos totais de proteínas dos parasitos promastigotas isolados de cães assintomáticos, foi possível verificar uma fração de 240 *spots* (Fig. 7), com a maioria entre uma porção de 10 a 70 KDa. Os géis de cães sintomáticos e assintomáticos do experimento foram reproduzidos em número, posição e intensidade igualmente em quatro amostras distintas.

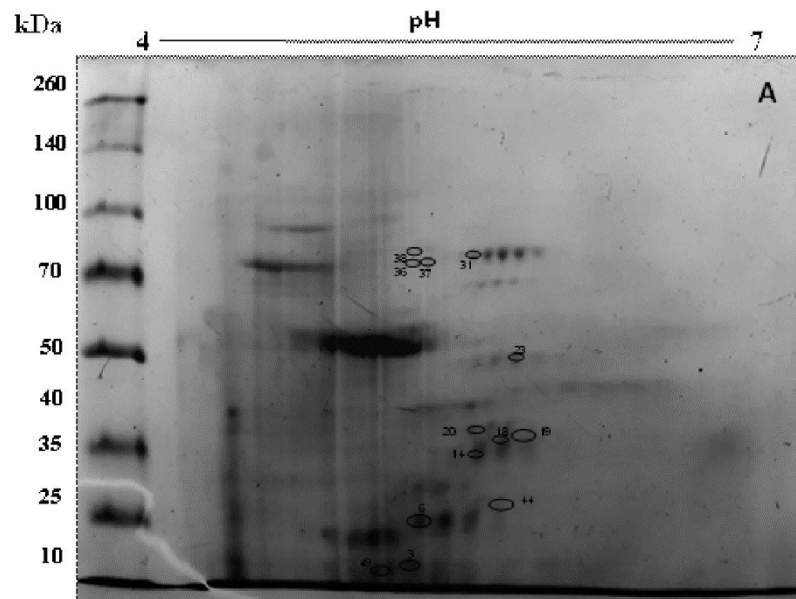


Figura 6: Géis bidimensionais do extrato protéico de parasitos da espécie *Leishmania infantum* isolados de cães sintomáticos. Géis 2D foram obtidos após a separação do extrato total das proteínas (250 µg) de parasitos de *L. infantum* isolados de cães sintomáticos (primeira dimensão: FIE pH 4-7 e a segunda dimensão: 12% SDS-PAGE). Os géis foram fixados e corados com Coomassie Brilliant Blue G-250. Os spots selecionados foram àqueles reconhecidos por anticorpos específicos presentes em pool de soro de cães sintomáticos, assintomáticos ou vacinados. Géis 2D foram realizados em quadruplicata, e uma amostra está representada.

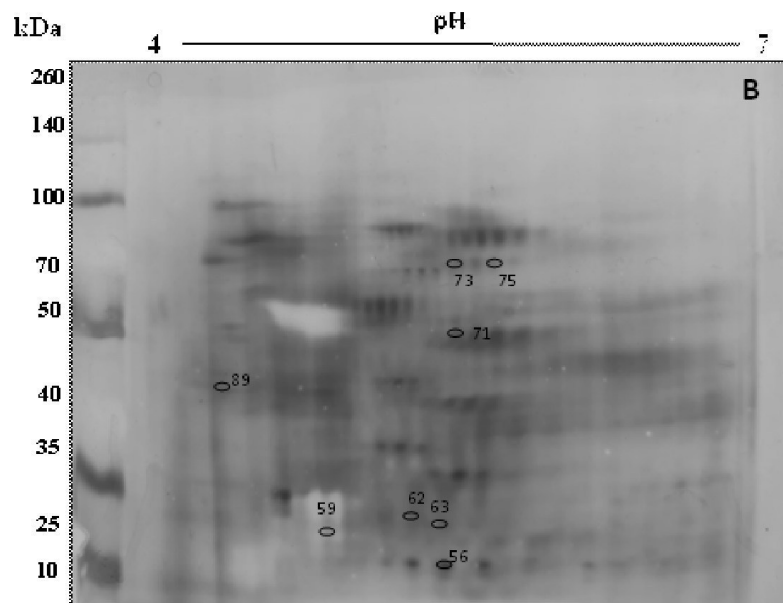


Figura 7: Géis bidimensionais do extrato protéico de parasitos da espécie *Leishmania infantum* isolados de cães assintomáticos. Géis 2D foram obtidos após a separação do extrato total das proteínas (250 µg) de parasitos de *L. infantum* isolados de cães assintomáticos (primeira dimensão: FIE pH 4-7 e a segunda

dimensão: 12% SDS-PAGE). Os géis foram fixados e corados com Coomassie Brilliant Blue G-250. Os spots selecionados foram àqueles reconhecidos por anticorpos específicos presentes em pool de soro de cães sintomáticos, assintomáticos ou vacinados. Géis 2D foram realizados em quadruplicata e uma amostra está representada.

Para avaliar a antigenicidade das proteínas presentes nos extratos totais de *L. infantum* isolados dos cães sintomáticos e assintomáticos, foram realizados Western Blotting utilizando pool de soros de cães sintomáticos ou assintomáticos. Na realização dos immunoblotting, também se utilizou um painel sorológico para avaliar a reatividade cruzada dessas proteínas frente a pool de soro de cães infectados com *E. canis*, *B. canis* ou cães saudáveis não infectados.

No painel imuno proteômico de extrato total de parasitos isolados de cães assintomáticos, utilizando-se pool de soros de cães não infectados, foi possível identificar a presença de 19 spots (Fig. 8A). A maior parte dos spots foram identificados entre 100 a 200 kDa. Já em relação às amostras de soros de cães sintomáticos e assintomáticos que foram utilizados nos ensaios de immunoblotting, os resultados demonstraram respectivamente a presença de 126 e 87 spots (Fig. 8 B e C) entre 20 a 140 kDa.

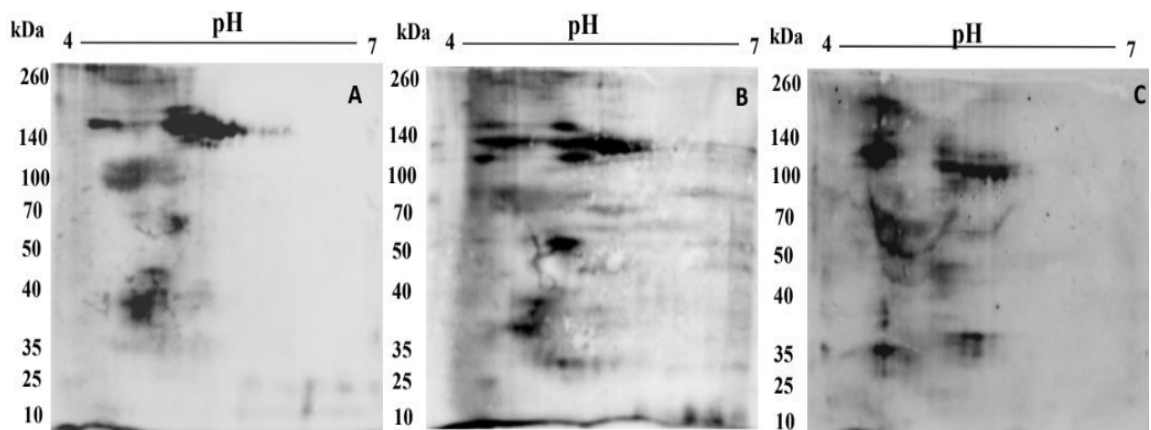


Figura 8: Análise Imunoproteômica das amostras de pool de soros de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no estágio promastigota isolados de cães assintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum* no estágio promastigota, que foram previamente isolados de cães assintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 a segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose e os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães não infectados (A), pool de soros de cães sintomáticos (B) e de cães assintomáticos (C). O conjugado utilizado foi anti IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto

isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (BenchMark™ Protein Ladder).

Com o propósito de avaliar a reatividade cruzada perante as proteínas presentes nos géis bidimensionais de parasitos isolados de cães assintomáticos, realizou-se o imunoblotting com soros de cães com erlichiose e babesiose (Fig. 9 A e 9 B), respectivamente. Com essa análise foi possível validar a presença de 21 e 34 *spots* respectivamente, sendo que para os blots de erlichiose a maioria dos *spots* se encontravam na fração de 70 a 260 kDa e nos blots para erlichiose de 50 a 140 kDa).

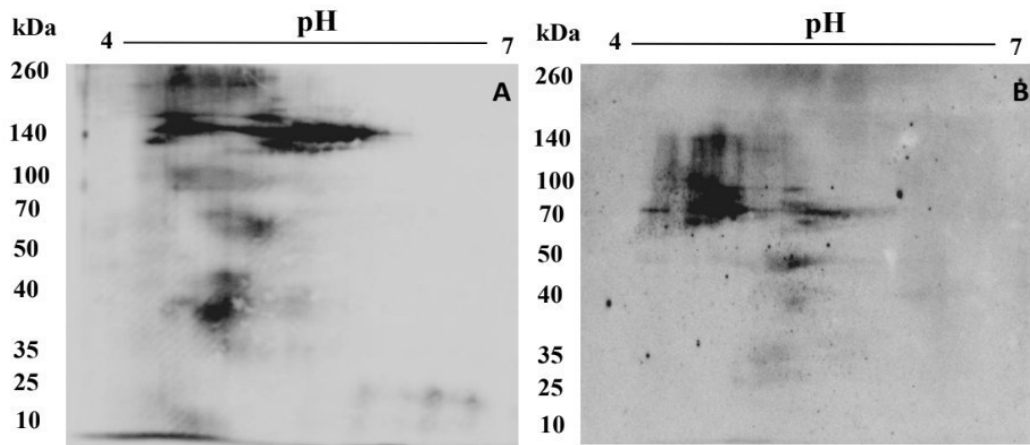


Figura 9: Análise imunoproteômica da reatividade cruzada das amostras de pool de soros de cães com *Erlischia canis* e *Babesia canis* frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no estágio promastigota isolados de cães assintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães assintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose. Os imunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães infectados com *Erlischia canis* (A) ou pool de soros de cães infectados com *Babesia canis* (B). O conjugado utilizado foi anti IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (BenchMark™ Protein Ladder).

No painel imunoproteômico dos géis bidimensionais obtidos do extrato total de proteínas de parasitos no estágio promastigota isolados de cães sintomáticos, empregando *pool* de soros de cães não infectados de área endêmica, observou-se cerca de 21 *spots* que reagiram nas membranas do blot (Fig. 10 A), em que a maioria estava concentrada na região entre 60 a 260 kDa. Nas análises dos Western Blottings realizados com *pool* de soros de cães sintomáticos

e assintomáticos (Fig. 10 B e 10C) foram observados 64 e 62 proteínas, respectivamente. Com isso, foi possível diferenciar que a grande fração dos *spots* que reagiram diante aos soros de animais sintomáticos encontram-se com a massa molecular entre 10 a 100 kDa e os *spots* identificados frente ao *pool* de soros de cães assintomáticos estão entre 10 e 50 kDa.

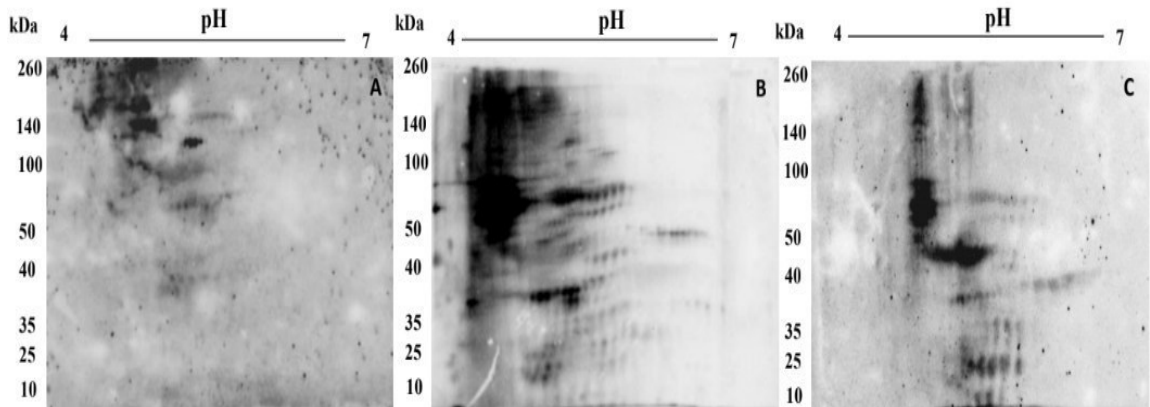


Figura 10: Análise Imunoproteômica das amostras de pool de soros de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no estágio promastigota isolados de cães sintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães sintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose e os Immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães não infectados (A), pool de soros de cães sintomáticos (B) e de cães assintomáticos (C). O conjugado utilizado foi anti IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (Benchmark™ Protein Ladder).

Com a finalidade de investigar a possível reatividade cruzada das proteínas existentes nos géis bidimensionais relacionados ao extrato total de parasitos dos isolados de cães sintomáticos, aplicou-se o *pool* de soros de cães infectados com os parasitos *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (Fig. 11A e 11B). Sendo assim, a análise permitiu verificar a presença de 15 e 12 *spots* respectivamente. Esses antígenos identificados em sua maior parte apresentaram-se concentrados entre 35 a 140 kDa para *E. canis* e 40 a 70 kDa para *B. canis*.

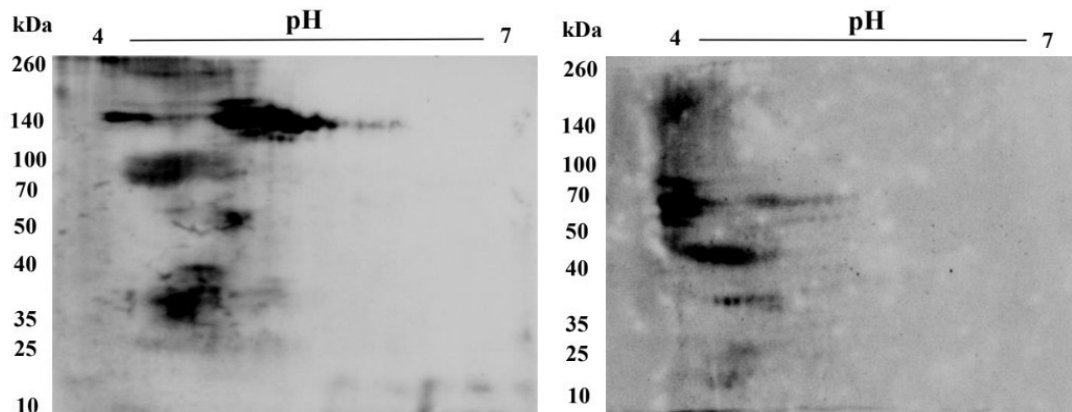


Figura 11: Análise Imunoproteômica da reatividade cruzada das amostras de pool de soros de cães frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no estágio promastigota e isolados de cães sintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães sintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão: 12% SDSPAGE), transferidos para membranas de nitrocelulose. Os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães com *Erichia canis* (A) ou pool de soros de cães infectados com *Babesia canis* (B). O conjugado utilizado foi IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (BenchMark™ Protein Ladder).

Nesse estudo também se realizou a análise dos immunoblottings com pool de soro de cães imunizados com a vacina Leish-Tec®. Nas membranas de Western blotting de extrato protéico isolados de cães sintomáticos verificou-se a presença de aproximadamente 30 spots (Fig. 12 A) entre a faixa de 10 e 50 kDa. Quando se avaliou o W. Blotting das membranas de proteínas totais isoladas de cães assintomáticos (Fig. 12 B), verificou-se a presença de 40 spots reativos, entre 10 e 60 kDa frente aos soros de cães imunizados com a vacina Leish-Tec®.

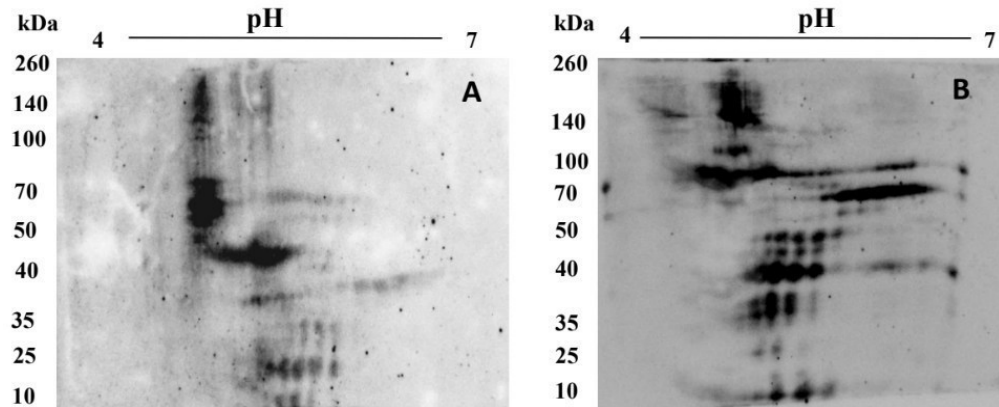


Figura 12: Análise imunoproteômica das amostras de pool de soros de cães imunizados com a leish Tec frente ao extrato total de proteínas de parasitos de *Leishmania infantum* no estágio promastigota isolados de cães sintomáticos e assintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães (A) sintomáticos e (B) assintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose. Os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães vacinados. O conjugado utilizado foi anti IgG total de cão, na diluição de 1:10000. O eixo x representa a faixa do ponto isoelétrico (PI), enquanto o eixo y representa o peso molecular (kDa), determinado pelo peso padrão comercial (BenchMark TM Protein Ladder).

5.2. Identificação de proteínas de promastigota de *Leishmania infantum* por MS/MS e suas características em banco de dados

Na análise dos spots selecionados, os arquivos de MGF gerados pelo software *Protein Post RunAnalyses* (Shimadzu Co., Japan) foram analisados pelos programas Mascot Server v. 2.4 e Peaks Studio v.7, contra um banco de dados personalizado que consistiu de todas as entradas UniProt do gênero *Leishmania spp.* excluindo os spots que apresentaram reatividade cruzada com *E. canis*, *B. canis* em cães saudáveis não infectados, um total de 90 spots foram analisados para serem identificados por espectrometria de massas no estágio promastigota do parasito. Os spots identificados (Fig. 13 e Fig. 14) foram obtidos de quatro preparações independentes, e foram considerados apenas os espectros obtidos em alta qualidade, sendo os demais excluídos da avaliação final.

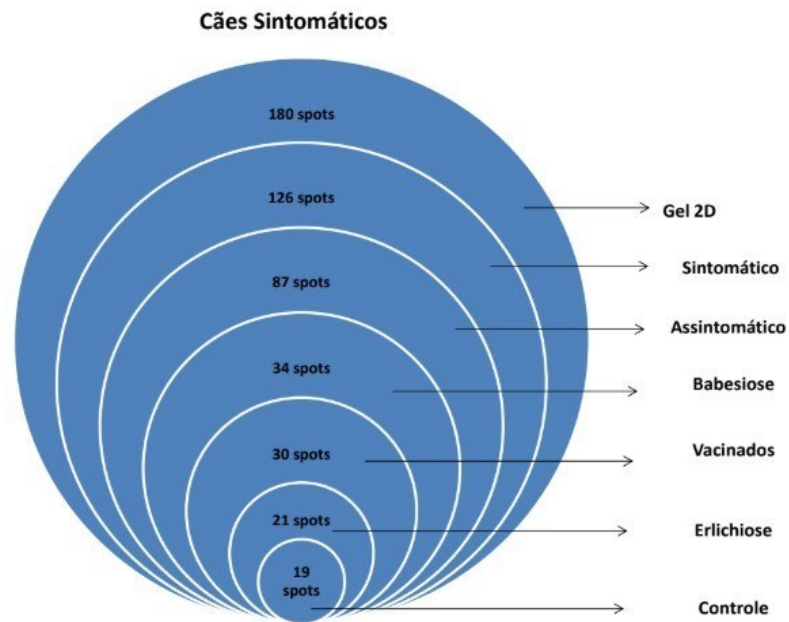


Figura 13: Relação de spots identificados nos géis bidimensionais e imunoblotting dos isolados de cães sintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães sintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7 e segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE), foram transferidos para membranas de nitrocelulose e os imunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães sintomáticos, assintomáticos, *E. canis*, *B. canis*, vacinados e controle (cães saudáveis de área endêmica). O número de spots corresponde aos spots reativos nos imunoblotting.

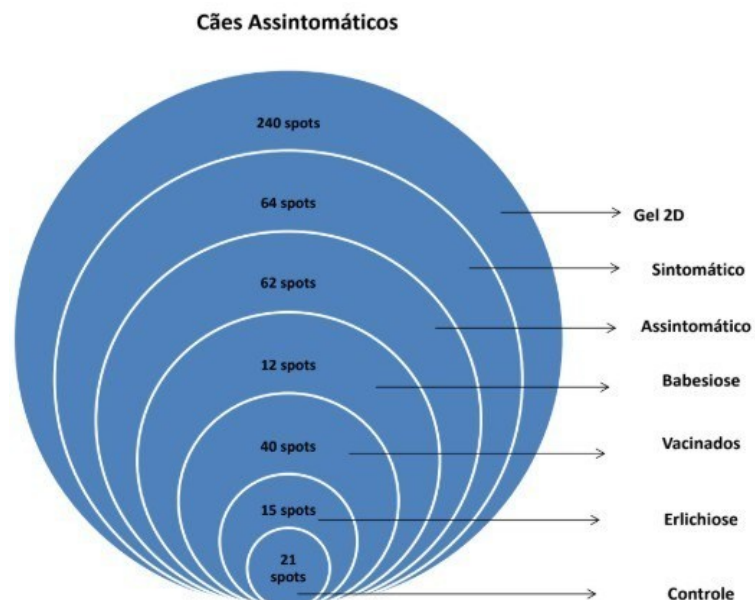


Figura 14: Relação de spots identificados nos géis bidimensionais e imunoblotting dos isolados de cães assintomáticos. Géis 2D foram obtidos a partir de extrato total de proteínas do parasito *L. infantum*, que foram previamente isolados de cães assintomáticos (250 µg). Foi realizada a primeira dimensão com FIE pH 4-7

e segunda dimensão em: 12% SDS-PAGE, foram transferidos para membranas de nitrocelulose e os immunoblottings foram revelados após a incubação das membranas com pool de soro de cães sintomáticos, assintomáticos, erlichiose, babeíose, vacinados e cães saudáveis de área endêmica. O número de spots corresponde aos spots reativos nos immunoblotting.

Foi possível constatar uma totalidade de 20 proteínas a partir da espectrometria de massas (Tabela 1). Das 20 proteínas identificadas, somente cinco são proteínas hipotéticas e 15 com função já descrita na literatura. E destas 20 proteínas, 7 delas (35%) foram constatadas somente no extrato total de proteínas de cães sintomáticos, 7 (35%) no extrato total de proteínas de animais assintomáticos e 6 (30%) proteínas em ambos os aspectos clínicos. (Fig. 15). Também se observou que 9 dessas proteínas estavam presentes na análise de imunoproteômica utilizando-se soro de cães imunizados. Dessas proteínas, 3 foram identificadas nos extratos de cães sintomáticos, 4 nos de cães assintomáticos e 2 em ambos os extratos.

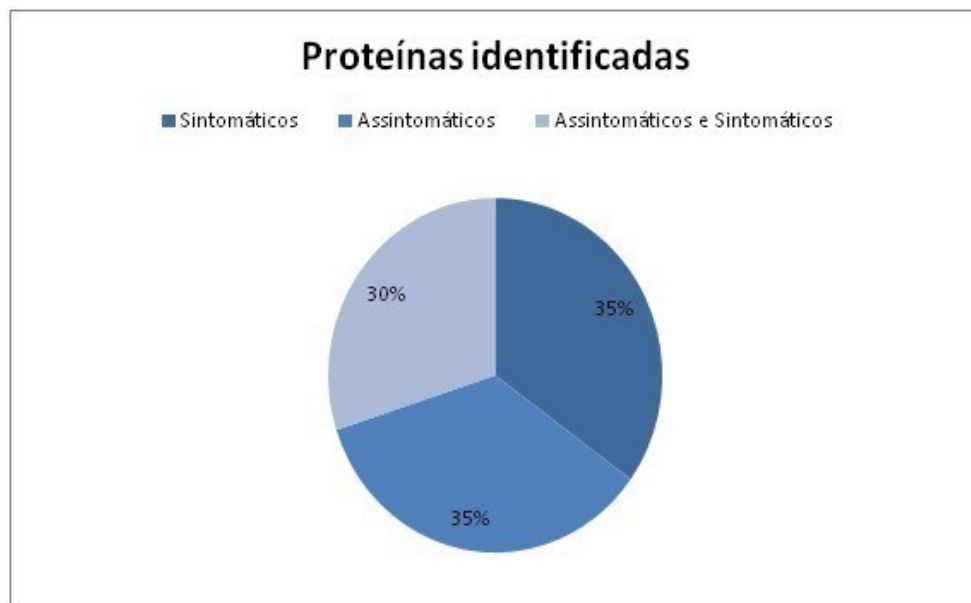


Figura 15: Proteínas identificadas dos parasitos da espécie *L. infantum* isolados de cães sintomáticos e assintomáticos. Percentual de proteínas identificadas por imunoproteômica, após análise por espectrometria de massas de acordo com o extrato total de proteínas de *L. infantum* avaliado (cães sintomáticos ou assintomáticos).

Diante da análise realizada das proteínas identificadas no estudo, foi possível observar que 15 delas já eram descritas na literatura. Sendo que algumas das proteínas, também já foram empregadas para validação em diagnóstico sorológico tanto para LV e LT, com as proteínas hsp70, beta tubulina, citocromo oxidase C e enolase, o que representa uma validação da

metodologia empregada neste estudo (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014 COELHO *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2015).

Das proteínas já descritas na literatura, foi possível observar grande relevância como potencial antígenos a serem empregues ao diagnóstico. As proteínas α - e β -tubulina são extremamente conservadas, possuem grande relevância na estrutura celular, sendo responsáveis por proporcionar a montagem heterodímera dos microtúbulos (MTs), que controla a forma, a divisão, motilidade e diferenciação das células, além de atuar no fuso mitótico para formação de cílios e flagelos (NOGALES, 2000; LUDUEÑA, 2013). Já as chaperonas como *heat shock proteins* (hsp70), são proteínas que no parasito *Leishmania sp.* estão envolvidas no processo de diferenciação de promastigota para amastigota, mas ainda não se sabe ao certo como ocorre esse processo (SCHLESINGER, 1990; QUIJADA *et al.*, 1996; BENTE *et al.*, 2003). A proteína enolase do parasito *Leishmania sp.* está localizada no citosol e está associada a face externa da membrana plasmática (QUIÑONES *et al.*, 2007). Além disso, a enolase na *Leishmania* atua como um receptor de plasminogênio, tornando-se um alvo para futuras terapias. Essa proteína também se mostrou como um bom biomarcador para o diagnóstico sorológico da LT, LV e LVC, além de ter sido empregada como alvo vacinal para as leishmanioses (DUARTE *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017). A proteína citocromo C oxidase é uma enzima localizada na membrana mitocondrial, atuando na cadeia de transporte de elétrons. Em 2012, essa proteína foi identificada em um estudo de imunoproteômica em *L. infantum* (COELHO VT *et al.*, 2012), e foi avaliada em sua forma recombinante para o diagnóstico da LT e LVC, apresentando boa acurácia no teste de ELISA (COELHO *et al.*, 2015). Proteínas relacionadas com a sobrevivência do parasito, degradação de proteínas, transporte intracelular e infectividade, também foram identificadas nos imublottings (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006; DIXIT, 2008).

Outras proteínas relacionadas com a sobrevivência do parasito, degradação de proteínas, transporte intracelular e infectividade, também foram identificados nos imublottings, como exemplo a proteína *RNA polymerase I*, que é enzimática e participa ativamente na transcrição, realizando a síntese de RNA (CRAMER *et al.*, 2008; HANNAN, 2013). A proteína *dynein heavy chain* possui ação motora no citoesqueleto, auxiliando no processo de movimentação. Essa proteína possui a característica de converter a energia química armazenada no ATP em trabalho mecânico, auxiliando no impulsionamento da batida dos cílios e flagelos (KARP, 2005). Já a proteína enzimática *cysteine peptidase- Clan CA- family C19*, desempenha um papel na sobrevivência dos mesmos, auxiliando no processo de propagação dentro do hospedeiro e auxiliando a atravessarem as barreiras celulares e teciduais (GOLDBERG, 2005; DIXIT, 2008; MCKERROW, 2006; SAJID, 2009). Outra proteína identificada foi *calpain-like cysteine*

peptidase, que possui ação enzimática, e que é encontrada na membrana de *Leishmania* (BARRET *et al.*, 2001). Ao que tudo indica é uma proteína relevante para a sobrevivência do parasito, estando relacionada com a taxa de multiplicação, além de que alterações nessas proteínas promovem alterações celulares, levando a morte do parasito (D'AVILA LEVY *et al.*, 2006).

Além dessas proteínas citadas acima, proteínas hipotéticas também foram identificadas neste estudo, sendo assim, elas não estão em nenhum banco de dados consultado, não possuindo a função química e biológica definida ou estudada. Isso posto, a caracterização química molecular destas proteínas é importante para definir possíveis perfis de reação *in vivo*, podendo ser realizada por métodos espectrométricos, como infravermelho e de massas, para posteriormente serem empregadas em métodos diagnósticos mais específicos e sensíveis do que os disponíveis atualmente (GALPERIN & KOONIN, 2004; SIVASHANKARI & SHANMUGHAVEL, 2006; GUPTA *et al.*, 2007).

Tabela 1: Proteínas identificadas no extrato total de formas promastigotas de *Leishmania infantum*. a) Nome da proteína (*L. infantum*); b) Número do spot identificado c) Número de acesso de acordo com TritypDB; d) Cobertura; e) AVG. MASS (DA); f) Ponto isoelétrico predito (pI); g) Peso molecular predito (em kDa); h) spot de acordo com o extrato dos cães.

PROTEÍNA	SPOT(S)	ACESSO	COVERAG E (%)	AVG - MAS S (DA)	pI	PESO M.	EXTRAT O PROTEIC O
alpha tubulin	3;23;82;89	LINF_1300078 00	18	49759	4.6 5	49758	S A
AAA - family ATPase - like protein	18;36;37;38;39; 73	LINF_3000305 00	6	15948 8	7.4 5	10011 7	S A
beta tubulin	3;8;49;84	LINF_0800177 00	12	46245	4.4 7	49752	S A
heatshock 70 - related protein 1 mitochondrial precursor putative	36;37;38;39;74	LINF_3000301 00	11	70529	5.8 2	71657	S A

PROTEÍNA	SPOT(S)	ACESSO	COVERAG E (%)	AVG - MAS S (DA)	pI	PESO M.	EXTRAT O PROTEIC O
Enolase	63	LINF_1400180 00	14	46092	5.1 2	46036	A
cytochrome oxidase subunit IV – putative	56	LINF_1200119 00	6	38191	5.5 1	39596	A
SPRY domain/HECT - domain (ubiquitin transferase)	31;71	LINF_3500595 00	0	73531 0	6.4	73315 8	S A
RNA polymerase I second largest subunit – putative	49	LINF_2500115 00	0	18124 3	8.1 3	18158 1	S
Hypothetical protein – conserved	63	LINF_3500068 00	3	29349	7.2 4	38872	A
Hypothetical protein – conserved	31;59	LINF_3200354 00	1	12003 3	9.4 7	12253 1	S A
Dynein heavy chain – putative	19;31	LINF_2300224 00	0	33439 4	6.1 9	54414 9	S
hypothetical protein – conserved	73	LINF_2400142 00	1	12106 3	9.6 7	11952 8	A
Cysteine peptidase - Clan CA - family C19 – putative	26	LINF_0900080 00	1	10158 3	7.1	10483 2	S
N - terminal region of Chorein - a TM vesicle - mediated sorter – putative	73	LINF_1600133 00	0	42919 0	8.2 3	60601 0	A
Pretranslocatio n protein - alpha subunit – putative	71	LINF_1100165 00	1	53967	9.0 7	53966	A

PROTEÍNA	SPOT(S)	ACESSO	COVERAG E (%)	AVG - MASS (DA)	pI	PESO M.	EXTRAT O PROTEIC O
Calpain - like cysteine peptidase – putative	6	LINF_270011100	0	600590	5.09	507736	S
Hypothetical protein conserved	49	LINF_040011200	1	134233	6.64	134351	S
Hypothetical protein conserved	20	LINF_320039900	0	126134	6.52	128440	S
ATP synthase subunit beta mitochondrial – putative	14;20;44	LINF_250017900	15	28341	4.92	525	S
Myotubularin related protein	75	LINF_120008300	0	334394	7.2	3230	A

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

5.3. Predição dos peptídeos e construção de uma proteína multi epítipo para validação no sorodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

A seleção das proteínas para a construção da quimera com destino ao diagnóstico utilizou-se os melhores epítipos para células B para todas as espécies de *Leishmania* e que não estejam presentes em espécies de *Trypanosoma* e *Leptomonas*. A quimera construída para validação no diagnóstico da LVC apresenta boa estabilidade e solubilidade em água. Em relação às propriedades físico-química, a quimera possui 133 resíduos, MW 14410,14g/mol, e pI10.79

Tabela 2: Proteínas selecionadas para a construção da Quimera para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina.

Proteína	Epítipo selecionado
>SUZ45848.1 hypothetical_protein_-_conserved [<i>Leishmania infantum</i>]:	SRYTEDSLTEYLDDVP
>SUZ44868.1 hypothetical_protein_-_conserved [<i>Leishmania infantum</i>]:	PRHSTSSQSHGHAMTVA
>SUZ42172.1 hypothetical_protein_-_conserved [<i>Leishmania infantum</i>]:	LAATASPSAQGSRLI

>SUZ38858.1 hypothetical_protein_- _conserved [<i>Leishmania infantum</i>]:	SQLDSPIRRRHTTR
>SUZ44915.1 hypothetical_protein_- [<i>Leishmania infantum</i>]: _conserved	VEQEAAEVSRSLSGRV

Sequência de aminoácidos

KKGKKPKKGVEQEAAEVSRSLSGRVGKDKPKDKGSQLDSPIRRRHTTR
 GKDKPKDKGSRYTEDSLTEYLDDVPGKDKPKDKGPRHSTSSQSHGHA
 MTVAGKDKPKDKGLAATASPSAQGSRLIEIGKKPKKGKK

Sequência de nucleotídeos

AAA AAA GGC AAA AAA CCT AAA AAA GGC GTT GAA CAA GAA GCT
 GCT GAA GTT TCT CGT TCT CTT TCT GGT CGT GTT GGC AAA GAT
 AAA CCT AAA GAT AAA GGC TCT CAA CTT GAT TCT CCT ATT CGT
 CGT CGT CAT ACT ACT CGT GGC AAA GAT AAA CCT AAA GAT AAA
 GGC TCT CGT TAT ACT GAA GAT TCT CTT ACT GAA TAT CTT GAT
 GAT GTT CCT GGC AAA GAT AAA CCT AAA GAT AAA GGC CCT CGT
 CAT TCT ACT TCT TCT CAA TCT CAT GGT CAT GCT ATG ACT GTT
 GCT GGC AAA GAT AAA CCT AAA GAT AAA GGC CTT GCT GCT ACT
 GCT TCT CGT TCT GCT CAA GGT TCT CGT CTT GAA ATTGGC AAA
 AAA CCT AAA AAA GGC AAA AAA

Figura 16: Sequências de aminoácidos e nucleotídeos: Sequência de aminoácidos e nucleotídeos utilizados para a construção da quimera para o diagnóstico da LVC.

```

KKGKKPKKGVEQEAAEVSRSLSGRVGKDKPKDKGSQLDSPIRRRHTTRGKDKPKDKGSRYTEDSLTEYLDDVPGKDKPKDKGPRHSTSSQSHGHAMTVAGKDKPKDKGLAATASPSAQGSRLIEIGKKPKKGKK
-----DSPIRRRHTTRGKDKP-----HGAMTVAGKDKPKDK-----
-----GVEQEAAEVSRSLSGR-----SRYTEDSLTEYLDDVP-----
-----SLTEYLDDVPGKDKPK-----SPSAQGSRLIEIGKKPK-----
-----SGRVGKDKPKDKGSQL-----PRHSTSSQSHGHAMTV-----
-----TTRGKDKPKDKGSRYT-----DKPKDKGPRHSTSSQS-----
-----AEVSRSLSGRVGKDKP-----GLAATASPSAQGSRL-----
-----GKKPKKGVEQEAAEVS-----

```

Figura 17: Confirmação da região de sequências de peptídeo para construção da quimera para o diagnóstico sorológico: Sequência dos peptídeos para construção da quimera para validação como marcador

sorológico. Os peptídeos foram agrupados linearmente com espaçamento de duas glicinas entre cada peptídeo e foram dispostos para se assemelhar à disposição em sua proteína da origem.

5.4. Predição dos peptídeos e construção de uma proteína multiepitopo para uso em uma composição vacinal contra a Leishmaniose Visceral Canina

Para a construção de uma proteína contendo multiepitopos de LT CD4 + e LT CD8 +, selecionou-se os melhores epítomos para células T e que não são preditos como epítomos para células B. Foram selecionadas regiões com a presença de epítomos específicos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, que possuíssem capacidade de estimular o desenvolvimento de uma resposta imune celular nos hospedeiros mamíferos. A proteína multiepitopo construída, apresenta boa estabilidade e solubilidade em água. Além disso, apresenta 110 resíduos, MW 11426.12 g/mol, e pI 5,04.

Tabela 3: Proteínas selecionadas para a construção da Quimera para uma composição vacinal contra a Leishmaniose Visceral Canina

Proteína	Epítopo Selecionado
>SUZ45848.1 hypothetical_protein_- _conserved [Leishmania infantum]	269-QQDSYAHAEMQRKVLALQCRR— 289
>SUZ44868.1 hypothetical_protein_- _conserved [Leishmania infantum]	969 – DLMASAADVVMNELELLRSG – 989
>SUZ42172.1 hypothetical_protein_- _conserved [Leishmania infantum]	1012 – SLVEEAAELLAKATVVY – 1028
>SUZ38858.1 hypothetical_protein_- _conserved [Leishmania infantum]	504 - VLEDTMTALAVSALPCGLTR- 523
>SUZ44915.1 hypothetical_protein_- _conserved [Leishmania infantum]	1183 -AVREAVLVLRTLSATVP- 1200

Sequência de aminoácidos

VLEDTMTALAVSALPCGLTRGPGDLMASAADVRVMNELELLRSGGPGS
LVEEAAELLAKATVVYGGPQQDSYAHAEMQRKVLALQCRRGPPGAVR
EAVLVLRTLSATVP

Sequência de nucleotídeos

GTT CTT GAA GAT ACT ATG ACT GCT CTT GCT GTT TCT GCT CTT
CCT TGT GGT CTT ACT CGT GGC CCT GGC GAT CTT ATG GCT TCT
GCT GCT GAT GTT CGT GTT ATG AAT GAA CTT GAA CTT CTT CGT
TCT GGT GGC CCT GGC TCT CTT GTT GAA GAA GCT GCT GAA CTT
CTT GCT AAA GCT ACT GTT GTT TAT GGC CCT GGC CAA CAA GAT
TCT TAT GCT CAT GCT GAA ATG CAA CGT AAA GTT CTT GCT CTT
CAA TGT GCT GCT GGC CCT CCT GGC GCT GTT GCT GAA GCT GTT
GCT CTT GTT CTT GCT ACT CTT TCT GCT ACT GTT CCT

Figura 18: Sequências de aminoácidos e nucleotídeos: Sequência de aminoácidos e nucleotídeos utilizados para a construção da quimera para a composição vacinal contra a LVC.

VLEDTMTALAVSALPCGLTRGPGDLMASAADVRVMNELELLRSGGPGSLVEEAAELLAKATVVYGGPQQDSYAHAEMQRKVLALQCRRGPPGAVREAVLVLRTLSATVP
-----ELLAKATVVYGGPQQD-----
-----CGLTRGPGDLMASAAD-----
-----TALAVSALPCGLTRGP-----
-----QQDSYAHAEMQRKVL-----
-----GSLVEEAAELLAKATV-----
-----LQCRRGPPGAVREAVA-----
-----AEMQRKVLALQCRRG-----
-----DVRVMNELELLRSGGP-----

Figura 19: Confirmação da região de sequência de peptídeos para construção da quimera para vacina: Sequência dos peptídeos para construção da quimera para validação como vacina. Os peptídeos foram agrupados linearmente com espaçamento de duas glicinas entre cada peptídeo e foram dispostos para se assemelhar à sua disposição da proteína de origem.

6 DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças encontradas em regiões subtropicais e tropicais no mundo. No Brasil, a LV é uma doença zoonótica com elevada incidência, sendo os cães domésticos os principais reservatórios nos ambientes urbanos, o que aumenta a disseminação da doença nesses locais (MORENO & ALVAR, 2002; BANETH *et al.*, 2008; ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2017). A LVC apresenta uma diversidade de manifestações clínicas e patológicas, com diferentes variações bioquímicas, hematológicas e histológicas. A carga parasitária também pode variar em cães infectados e de acordo com os órgãos acometidos (GIUNCHETTI *et al.*, 2006; ORDEIX *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2017). Diversos estudos têm sido realizados ao longo dos últimos anos em busca de relacionar as manifestações clínicas e a carga parasitária na progressão da LVC, tendo em vista um maior conhecimento do processo patológico para um melhor manejo dessa doença (RESENDE *et al.* 2020).

Devido a sua importância dentro do cenário da LV no Brasil, os cães fazem parte do controle epidemiológico da doença. O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) possui como objetivos o controle e prevenção da LV, bem como o diagnóstico clínico-laboratorial da doença, seguido do tratamento dos casos humanos, uso de inseticidas nas áreas de circulação do vetor, a identificação e eutanásia de cães infectados e medidas educativas para a população. Entretanto, observa-se uma expansão da LV, o que pode estar relacionado diretamente com a periodicidade do próprio ciclo da doença ou mesmo com as ações de controle que são atualmente empregadas não têm demonstrado efetividade para diminuir o número de casos e a incidência da doença no Brasil (GRIMALDI *et al.*, 2012; LAURENTI *et al.*, 2013; COURA-VITAL *et al.*, 2014; RODRIGUES MR *et al.*, 2019). Assim, tendo em vista a ineficiência das medidas de controle empregadas atualmente em adição às necessidades de melhores medidas profiláticas e controle da doença, diversos estudos voltados para a pesquisa de novos antígenos capacitados para serem empregados em testes sorológicos e para validação como imunógenos têm sido realizados.

Biomarcadores para o diagnóstico sorológico da LVC são importantes para auxiliar no resguardo da transmissão da doença, bem como para evitar o sacrifício desnecessário de cães que não possuem a doença. Atualmente, existe uma elevada frequência de cães assintomáticos em áreas endêmicas e que podem servir de reservatório para os vetores continuarem a transmissão da doença para outros animais susceptíveis e aos seres humanos. Além disso, a dificuldade de detecção direta do parasito e as limitações dos métodos diagnósticos atualmente disponíveis e padronizados fazem com que o desenvolvimento de métodos de diagnóstico

rápidos e precisos para infecção canina seja essencial para programas de vigilância e controle da doença (CHAVEZFUMAGALLI *et al.*, 2013; RODRIGUES MR *et al.*, 2019).

Recentemente, diversos estudos buscam investigar o desenvolvimento de novas composições vacinais, que sejam mais eficazes e seguras, com o intuito de serem recomendadas na prevenção das leishmanioses, visto que os tratamentos disponibilizados possuem limitações, como os níveis de toxicidade, os longos períodos de regime terapêutico padronizados, o que pode causar uma diminuição na adesão por parte do paciente e proporcionar a manutenção da doença, além do elevado custo dos medicamentos (CHAVEZFUMAGALLI *et al.*, 2015). Contudo, a pesquisa por novos candidatos para composições vacinais tem se apresentado como um processo complexo, ainda que seja considerado pelo serviço de saúde como uma melhor alternativa para o controle da transmissão da doença. (LAGE *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2018). Nesse sentido, existe a necessidade de identificar novos antígenos que possam ser testados como imunobiológicos na profilaxia das leishmanioses e que consigam desenvolver uma apta resposta imune protetora e de memória nos hospedeiros vertebrados, ativando linfócitos T CD4+ e TCD8+(LAGE *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, os estudos de proteoma e imunoproteômica têm contribuído para a identificação de novos antígenos, que possibilitam ter uma melhor compreensão da biologia do parasito e que também possuem aplicação no imunodiagnóstico e em desenvolvimento de composições vacinais para as leishmanioses (COELHO *et al.*, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2015; LAGE *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2020). A investigação de proteínas expressas pelos parasitos de *L. infantum* consiste em um método novo, no qual se avalia possíveis alvos para diagnóstico mais seletivo, considerando apenas genes funcionais, ou seja, aqueles que são expressos independentemente das condições de exposição do parasito (TJALSMA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2017). Em adição, a integração dessa ferramenta com estudos de bioinformática, permite o mapeamento de epítomos alvos de proteínas identificadas nos mapas proteômicos de microrganismos patogênicos, melhorando assim a identificação da capacidade antigênica das proteínas. Essa ferramenta contribui no processo de busca e seleção de candidatos mais seletivos e refinados, possibilitando biomarcadores para o diagnóstico sorológico com maior acurácia e candidatos a vacinas que gerem resposta imunológica protetora e duradoura (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2020a; MACHADO *et al.*, 2020b).

Nesse sentido, o presente estudo adotou uma abordagem imunoproteômica empregando extratos totais de parasitos de *L. infantum* no estágio de promastigota, em que os parasitos foram

isolados de cães domésticos com perfil clínico caracterizado como sintomáticos ou assintomáticos, de uma área endêmica para a doença no estado de Minas Gerais. Para a realização dos Westerns Blots, empregou-se *pool* de soros de cães sintomáticos e assintomáticos, bem como de *E. canis*, *B. canis* e *pool* de soros de cães não infectados de área endêmica. Os *spots* analisados foram aqueles que não apresentaram reatividade cruzada com os soros de cães não doentes e soro de doenças correlacionadas utilizados no trabalho. Em uma segunda etapa, também se avaliou nos experimentos de Westerns Blots o uso de *pool* de soros de cães imunizados com a vacina comercialmente disponível atualmente no Brasil (Leishtec®), para identificação de alvos para serem avaliados posteriormente como imunógenos. O uso de *pool* de soros de cães neste estudo diminuiu o impacto da variação da resposta imune dos cães em relação aos antígenos presentes no extrato como já descrito na literatura (COELHO *et al.*, 2012; DUARTE *et al.*, 2015; LAGE *et al.*, 2019; MACHADO AS *et al.*, 2020).

Ao todo foram identificadas 20 proteínas por MALDI-TOF/TOF e espectrometria de massas. Esses antígenos foram reconhecidos tanto por soros de cães sintomáticos quanto soro de cães assintomáticos e vacinados. Proteínas identificadas nesse estudo, como alfa e beta-tubulina, HSP70 (*heat shock proteins*), enolase e citocromo oxidase também foram observadas em outros estudos de imunoproteômica (COELHO *et al.*, 2012, DUARTE *et al.*, 2015), validando a análise realizada neste trabalho. Dentre as proteínas identificadas, algumas foram detectadas em múltiplos *spots* ou como fragmentos proteolíticos. Embora os extratos proteicos tenham sido obtidos na presença de coquetel inibidor de protease, a degradação proteica não pode ser descartada. Além disso, diversos estudos associam esse achado com a presença de isoformas ou à extensa modificação e processamento pós-traducional de proteínas, que são alterações comumente vistas em espécies de *Leishmania* e em outros Tripanossomatídeos (BROTHERTON *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2015; LAGE *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2020).

Diferentes estratégias têm sido conduzidas em estudos proteômicos com o intuito de compreender melhor a biologia do parasito, resposta imune dos hospedeiros às infecções por diferentes espécies de *Leishmania* (MAGALHÃES *et al.*, 2014. MACHADO *et al.*, 2020). Estudos recentes que também utilizaram a abordagem imunoproteômica para identificar proteínas de *Leishmania braziliensis* para o diagnóstico sorológico da LT utilizaram soros de indivíduos com leishmaniose tegumentar com diferentes manifestações clínicas, como LC e LM. Com o intuito de diminuir a reatividade cruzada, além de soros de indivíduos saudáveis residentes em área endêmica para a doença, utilizaram-se soros de indivíduos com doença de Chagas. Os *spots* reativos frente a esses soros foram excluídos, sendo identificado um total de

20 proteínas, dentre elas a enolase e hsp70 identificadas também nesse estudo (DUARTE *et al.*, 2015). As proteínas selecionadas no trabalho de (DUARTE *et al.*, 2015), foram avaliadas em testes sorológicos em sua forma recombinante, apresentando elevados valores de sensibilidade e especificidade. Além disso, essas proteínas também foram avaliadas posteriormente como vacinas e apresentaram eficácia protetora contra diferentes espécies de *Leishmania* (DUARTE *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2017a; DUARTE *et al.*, 2017b; SANTOS *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2017).

Um estudo proteômico utilizando a espécie *L. amazonensis*, (MAGALHÃES *et al.*, 2014) avaliou a variação na expressão de proteínas desses parasitos em culturas *in vitro* em diferentes tempos de cultivo, totalizando 150 dias de cultura. Os resultados demonstraram 37 proteínas que apresentaram uma diminuição da expressão ao longo do cultivo, enquanto 19 proteínas apresentaram um aumento em sua expressão, à medida que aumentava o tempo em que esses parasitos eram mantidos em cultura. Os autores demonstraram que as proteínas associadas com a diminuição de expressão são consideradas fatores de virulência, e que sua diminuição de expressão se relaciona com a redução da infectividade do parasito *in vitro* e *in vivo* (MAGALHÃES *et al.*, 2014).

Outro trabalho recente utilizou a abordagem imunoproteômica com soros de indivíduos com LV e utilizou a estratégia de exclusão de *spots* reativos frente a soros de indivíduos com Doença de Chagas e indivíduos saudáveis de área endêmica (LAGE *et al.* 2019). Duas proteínas a endonuclease III e a GTPbinding foram avaliadas em sua forma recombinante em experimentos de ELISA, apresentando alta sensibilidade e especificidade. (MACHADO *et al.*, 2020), identificou antígenos de *L. infantum* através da abordagem imunoproteômica, em que se utilizaram soros de indivíduos com LV, HIV e indivíduos coinfectados com LV e HIV (LV/HIV), além de indivíduos saudáveis. Os resultados demonstraram 43 *spots* reativos para LV e LV/HIV, sendo identificadas 26 proteínas por espectrometria de massas. A proteína β tubulina foi testada em sua forma recombinante e apresentou boa acurácia para detectar indivíduos com LV e indivíduos coinfectados com LV e HIV.

A detecção de cães assintomáticos é essencial para o controle da doença e para evitar a transmissão contínua para outros animais susceptíveis e para os seres humanos (RODRIGUES *et al.*, 2019). As limitações dos métodos diagnósticos atuais fazem com que ainda seja importante a pesquisa por antígenos para que possa melhorar a acurácia dos testes sorológicos da LVC. Infecções em cães transmitidas por vetores, como a leishmaniose, erliquiose e babesiose, estão entre as doenças caninas mais comuns nas regiões tropicais e subtropicais no mundo (YISASCHAR-MEKUZAS *et al.*, 2013). A coinfeção entre mais de um patógeno pela

quantidade de vetores hematófagos e capacidade de transmissão de vários patógenos simultaneamente, tem sido frequente. A infecção por *Ehrlichia canis* é causada por uma bactéria Gram negativa intracelular que infecta monócitos, sendo transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus Sanguineus*. Já as infecções causadas por Babésia são transmitidas por pelo menos seis espécies distintas, sendo a principal a *Babesia canis*, que ocorre através da picada do carrapato de Ixodídeos, do Gênero *Rhipicephalus* (DANTAS-TORRES *et al.*, 2008; COSTA, *et al.*, 2012; KRAWCZAK *et al.*, 2015). Diversos estudos demonstram que anticorpos contra *B. canis* e *E. canis* possuem reação cruzada em testes sorológicos para leishmaniose (MANCIANTI, *et al.*, 1996; METTLER *et al.*, 2005; KRAWCZAK *et al.*, 2015).

Isto posto, as reações cruzadas entre a leishmaniose e essas doenças parasitárias causadas por determinantes antigênicos comuns, impedem os diagnósticos específicos da leishmaniose, principalmente em regiões onde essas doenças são endêmicas. Assim, têm sido desenvolvidas novas estratégias na tentativa de melhorar a qualidade dos antígenos aplicados para o sorodiagnóstico das leishmanioses. Alguns deles foram direcionados para a caracterização e produção de versões recombinantes de antígenos individuais de parasitos e muitos se mostraram promissores para o sorodiagnóstico (RODRIGUES *et al.*, 2019). No presente estudo, a estratégia utilizada representa um refinamento na busca de antígenos mais específicos para o diagnóstico da doença, pois exclui grande parte da reatividade cruzada de duas doenças que acometem cães no ambiente urbano, como a erliquiose e a babesiose.

O uso desses soros é relevante, tendo em vista a alta reatividade cruzada em testes sorológicos, e podem assim justificar o baixo número de proteínas identificadas neste estudo. Além disso, a análise dos antígenos selecionados nesse estudo permitiu construir uma proteína multiepitopo que poderá aumentar a acurácia dos métodos sorológicos, já que possuem regiões de epítomos selecionados por imunoinformática que são reconhecidos preferencialmente por LB.

Estudos de biomarcadores se fazem necessários para avaliar a evolução clínica LVC, associadas a perfis de resistência ou susceptibilidade, que podem orientar o desenvolvimento de novas vacinas para o controle da doença. Assim, a pesquisa e conhecimento de biomarcadores atribuídos à manutenção assintomática da doença têm sido aplicados para avaliar a eficácia em vacinas e abordagens de tratamento (COELHO *et al.*, 2012; RESENDE *et al.*, 2020).

A escolha do extrato proteico neste trabalho também foi diferencial, visto que foram selecionadas cepas de parasitos de *L. infantum* que foram isolados de cães domésticos naturalmente infectados classificados como sintomáticos ou assintomáticos de uma região

endêmica para a doença. Sabe-se que a evolução das manifestações da doença depende em grande parte da resposta imunológica do hospedeiro e na LVC a resposta imune está altamente associada ao perfil patogênico durante a infecção (REIS *et al.*, 2010; DE ALMEIDA *et al.*, 2014). A resposta imunológica na LVC associa-se a um perfil de controle da infecção, associados a uma resposta imune T_H1 , com produção de diversas citocinas como IL-12, INF, TNF- α , e uma resposta imunológica T_H2 associada à suscetibilidade a infecção (FERRER *et al.*, 2002). Diversos estudos demonstram que as respostas humorais IgG1 e IgG2 são dependentes de linfócitos T, e que a correlação com respostas imunes protetoras exige uma produção maior de IgG2 (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2017; GIUNCHETTI, *et al.*, 2019).

Além disso, os cães apresentam formas clínicas severas na LVC, a depender da resposta imunológica, associadas a alta densidade na carga parasitária, infiltrado inflamatório na pele, composto basicamente por células mononucleares (GIUNCHETTI *et al.*, 2006; MENEZES-SOUZA *et al.*, 2011). Em 2012, (COELHO *et al.*, 2012) utilizaram extrato total de proteínas de *L. infantum* (Cepa BH46) nos estágios promastigotas e amastigotas, e avaliou a presença de *spots* com *pool* de soros de cães sintomáticos, assintomáticos e de cães não infectados.

As proteínas identificadas por espectrometria de massas foram aquelas que reagiram tanto com *pool* de soros de cães sintomáticos, quanto de assintomáticos. Das proteínas selecionadas, diversas foram avaliadas na forma recombinante, apresentando boa eficácia nos experimentos de vacina e diagnóstico (MARTINS *et al.*, 2013; LAGE *et al.*, 2015; LAGE *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2018).

No presente estudo, o perfil proteômico do extrato total de parasitos isolados de cães assintomáticos apresentaram *spots* com massa molecular entre 10 e 70 kDa e o sintomático 10 a 60 kDa. Esses *spots* foram reativos frente a soros de cães sintomáticos e assintomáticos. Nos extratos de parasitos isolados de cães sintomáticos, também houve reatividade dos soros de cães sintomáticos e assintomáticos que em sua maior parte dos *spots* reativos encontram-se com a massa molecular entre 10 a 100 kDa e entre 10 e 50 kDa, respectivamente. Dessa forma, em nosso estudo, a utilização de extratos proteicos de cães que diferem pelos sinais clínicos, irá ajudar na compreensão de biomarcadores associados à resistência ou susceptibilidade durante a LVC além de fornecer informações para o desenvolvimento de melhores métodos para diagnóstico, novos imunógenos e ser útil no protocolo terapêutico para cães infectados.

Atualmente, no Brasil, está disponível apenas uma vacina licenciada pelo Ministério da Agricultura para comercialização, a Leish-Tec® (CEVA Saúde Animal LTDA), que utiliza a proteína A2, identificada em *L. danovani*, sendo que esta proteína representa o primeiro fator

de virulência identificado no estágio amastigota de *Leishmania ssp.* (COELHO *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2008). Embora tenha sido demonstrado que uma das vantagens dessa vacina seria a produção de anticorpos específicos anti-A2 e que não haveria produção de anticorpos contra extrato solúvel de *Leishmania* (SLa), alguns estudos têm demonstrado que cães podem sofrer soroconversão e apresentar anticorpos IgG contra proteínas do parasito, o que têm sido observados em vários testes sorológicos empregados na LVC (FERNANDES *et al.*, 2014; DE MENDONÇA *et al.*, 2016).

Os estudos demonstraram que cães imunizados com essa vacina, desenvolvem uma resposta imune com perfil TH1, com a produção de anticorpos IgG2 e baixos níveis de IgG1, correlacionando esse perfil humoral com o aumento da produção de INF- γ (FERNANDES *et al.*, 2008).

Nesse sentido, nesse estudo também utilizamos *pool* de soros de cães imunizados com a vacina Leish-Tec®. Os géis bidimensionais dos extratos de proteínas de *L. infantum* isolados de cães sintomáticos e assintomáticos apresentaram *spots* reativos frente a esses soros, em sua maior parte entre 1040 kDa. Esses *spots* reativos não foram excluídos da análise, visto que a presença de anticorpos de cães imunizados reconheceu antígenos presentes dos parasitos isolados dos dois estágios clínicos de infecção dos cães. Nossos dados demonstram que os immunoblots utilizando extrato total de parasitos isolados de cães assintomáticos apresentaram maior reatividade frente ao *pool* de soro de cães imunizados do que o extrato total de cães sintomáticos. Esse maior número de antígenos do extrato de cães assintomáticos reconhecidos pelos anticorpos poderia estar associado com um perfil de indução de respostas protetoras, tornando-se possíveis imunógenos a serem avaliados em testes de vacinas. Ademais, as estratégias de seleção de epítomos empregadas para compor a proteína quimérica que será utilizada na composição vacinal propostas no presente estudo pretendem possibilitar uma vacina efetiva em um modelo murino, com o potencial de ser aplicada posteriormente na prevenção da LVC.

Nesse contexto, mais estudos se fazem necessários para que as proteínas identificadas nesse estudo também possam ser avaliadas individualmente. As proteínas identificadas representam uma contribuição na identificação de novos antígenos de *L. infantum*, para compreender melhor o papel biológico dessas proteínas no metabolismo, patogênese, virulência do parasito e o perfil de desenvolvimento das diferentes manifestações clínicas na LVC através das proteínas expressas nas diferentes cepas dos parasitos que foram utilizados. Nossa perspectiva é gerar produtos derivados de biotecnologia que possam ser disponibilizados para

a população sob a forma de uma vacina efetiva e um diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade, que auxiliará no controle da doença em nosso país.

7 CONCLUSÃO

Com base nos dados gerados no presente estudo, foi possível identificar 20 proteínas através da tecnologia de proteômica e imunoproteômica associadas à espectrometria de massas com potencial de serem avaliadas em experimentos de vacina e diagnóstico. A identificação dessas proteínas contribui para um maior conhecimento sobre a biologia do parasito e patologia da doença no principal reservatório da doença, que é o cão. Além disso, em conjunto com análises de imuno-informática, foi possível construir duas proteínas multiepitopos que serão validadas em estudos futuros para composição vacinal e biomarcadores para o sorodiagnóstico da LVC.

8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

- Clonagem, expressão e purificação das proteínas selecionadas para vacina e diagnóstico; avaliar, em modelo murino, a eficácia da proteína quimérica contra a infecção por *L. infantum*;
- Realizar testes sorológicos de ELISA com as proteínas, proteína quimérica e peptídeos sintéticos utilizando soros de cães com LVC sintomáticos, assintomáticos, e soro de doenças correlacionadas;
- Realizar a proteômica e imunoproteômica dos parasitos no estágio amastigota, considerando as mesmas condições realizadas no presente estudo.

9 REFERÊNCIAS:

- ABRANCHES P. *et al.* Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. *Acta Med Port*, v.10, p.871-5, 1998.
- ABUJAMRA L. C.; MONTEIRO R. C. P. Leishmaniose visceral canina e sua importância na saúde pública: revisão de literatura / Canine Leishmania Infections and its importance in public health: review / Leishmaniasis Visceral Canina y su importancia en la salud pública: revisión de literatura. *Nosso Clín*, v. 19, p. 50-56, 2016.
- AKHOUNDI M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *Neg. PLoS Trop. Dis.*, v.10, p. 1371, 2016.
- ALVAR J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, v. 7, p. e3567, 2012.
- ASHFORD R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v. 30, p. 1269-81, 2000.
- AVILA HÁ *et al.* Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*, v. 3, p. 1811-29, 2003.
- BAHARIA R. K. *et al.* Recombinant NAD-dependent SIR-2 protein of *Leishmania donovani*: immunobiochemical characterization as a potential vaccine against visceral leishmaniasis. *PloSNeglTropDis*, v. 9, 2015.
- BAILEY F. *et al.* Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. *PLoS Negl Trop Dis*. v. 13, 2019.
- BANETH G. A.F. *et al.* Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.
- BARRAL A. *et al.* The relevance of characterizing *Leishmania* from cutaneous lesions: a simple approach for isolation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v.82, p. 579-583, 1987.
- BARRET A.J. *et al.* The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol*, 134, 95-102, 2001.
- BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 328– 337, 2004.
- BELO, V. S. *et al.* Reliability of techniques used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the national control program in Brazil: A survey in an area of recent transmission. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 146, p. 10-15, 2017.
- BENTE M. *et al.* Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*. v.3, p.1811-1829, 2003.

- BERN C. *et al.* Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 2, p. e313, 2008.
- BONGIORNO G., *Et al.* Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs – a preliminary xenodiagnosis study. *Vet Parasitol.* v. 197, P. 691–695, 2013.
- BORJA L.S. *et al.* Fraga, high accuracy of an ELISA test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil - a phase II study, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 12 (10), 2018.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Guia de orientação para vigilância de leishmaniose visceral canina (LVC). Santa Catarina. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Brasília. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, MS. 814 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2014.
- BRAZIL, R. P. *et al.* Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - a mini review. *Entomology, Ornithology and Herpetology*; v. 4, p. 144, 2015.
- BROTHERTON M.C. *et al.* Analysis of stage-specific expression of basic proteins in *Leishmania infantum*. *J Proteome Res* 9: 3842–3853, 2010.
- BROTHERTON M.C. *et al.* Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 4, 126-132, 2014.
- BRUHN F.R.P. *et al.* Spatial and temporal relationships between human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006–2013. *Parasit Vectors.* 28;11(1):372, 2018
- BURNS J.M. *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci*, v. 90, p. 775-779, 1993.
- CHAKRAVARTY J. *et al.* Determinants for progression from asymptomatic infection to symptomatic visceral leishmaniasis: a cohort study. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 13 (3), 2019.
- CHAPPUIS F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

- CHÁVEZ-FUMAGALLI M.A. *et al.* New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop*, 48:235–242, 2015.
- CHAVEZ-FUMAGALLI M.A. *et al.* Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 20, 835-841, 2013.
- CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary record*, v. 141, p. 539- 543, 1997.
- COELHO E. A. F. *et al.* Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, p. 370379, 2015.
- COELHO E. A. *et al.* Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun*, v.71, n.7, p.3988-94, 2003.
- COELHO E.A. *et al.* Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 215. 63–71, 2016.
- COELHO V.T. *et al.* Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS neglected tropical diseases*, v.6, p.1430, 2012.
- COSTA L. E. *et al.* Mimotope-Based Vaccines of *Leishmania infantum* Antigens and Their Protective Efficacy against Visceral Leishmaniasis. *Plos One*, v. 9, p. 110014, 2014.
- COSTA L.E. *et al.* Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. *Clin Vaccine Immunol*, v. 21, n.1, p. 96–106, 2013.
- COURA-VITAL W. *et al.* Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One*, v. 9, n. 3, p. e91009, 2014.
- CRAMER P. *et al.* Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys*, v.37, p.337–352, 2008.
- CUPOLILLO, E. *et al.* A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, v. 16, p.142–144, 2000.
- D’AVILA-LEVY C.M. *et al.* Antileishmanial activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. *Int J Antimicrob Agents*, v. 28, p.138-142, 2006.
- DA SILVA SANTOS C. *et al.* Proteome profiling of human cutaneous leishmaniasis lesion. *The Journal of investigative dermatology*, v. 135, p. 400-410, 2015.
- DA SILVA, T. A. M. *et al.* Spatial and temporal trends of visceral leishmaniasis by mesoregion in a southeastern state of Brazil, 2002-2013. *PloSNeglTropDis*, v. 11, p. 0005950, 2017.

- DANTAS-TORRES F. Causative agents of canine babesiosis in Brazil. *Prev Vet Med*, v. 83, p.210-211, 2008.
- DANTAS-TORRES F. *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, v. 28, p. 531-538, 2012.
- DANTAS-TORRES F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, v.149, p. 139–146, 2007.
- DAS, A.; ALI, N. Vaccine development against *Leishmania donovani*. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. 99, p. 1-19, 2012.
- DE ALMEIDA LEAL G.G. *et al.* Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, v. 15, p. 472-82, 2014.
- DE MENDONÇA *et al.* Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similares to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*, v. 30, p. 472, 2016.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*, v. 27, p.305-318, 2004.
- DIXIT A.K. Immunodiagnostic/protective role of cathepsin L cysteine proteinases secreted by *Fasciola* species. *Vet. Parasitol*, v. 154, p.177–184, 2008.
- DOS SANTOS NOGUEIRA F. *et al.* Uso da miltefosina no tratamento da leishmaniose visceral canina causada por *Leishmania infantum* no Brasil. *Parasites Vect*, v. 12, p. 79, 2019.
- DRUMMELSMITH J. *et al.* Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Molecular & cellular proteomics :MCP*, v. 2, p. 146-155, 2003.
- DUARTE M. C. *et al.* Aneff ective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mecanismo factionof 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral andtegumentary leishmaniasis. *VeterinaryParasitology*, v. 217, p. 81 – 88, 2016.
- DUARTE M. C. *et al.* Recent updates and perspectives on approaches for the development of vacines against visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 49, n. 4, p. 398–407, 2016.
- DUARTE M. C., *et al.* Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach applied with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 22(11):1187-1196. 2015.
- DUARTE M.C. *et al.* A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from *Leishmania braziliensis* cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Immunobiology*, v.222, p. 251260, 2017.
- DUARTE M.C. *et al.* Performance of *Leishmania braziliensis* enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol*, v. 30, p. 7781, 2017.

- DUPREY Z.H. *et al.* Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis*, v. 12, p. 440–6, 2006.
- EJAZI, S. A.; ALI, N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 11, n. 1, p. 79-98, 2013
- EL FAKHRY Y.E. *et al.* A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v. 2, p. 1007–1017, 2002.
- EMINI E.A. *et al.* Induction of hepatitis A virus: neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*, v. 55, p. 836-839, 1985.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. LetiFend: Summary of Product Characteristics; 2016. (Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/003865/WC500207742.pdf)
- FALCÃO DE OLIVEIRA E. *et al.* Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *PLoS Negl Trop Dis*, v.11, p. e0005401, 2017.
- FERNANDES A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v. 26, p. 5888–5895, 2008.
- FERNANDES C.B. *et al.* Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnoses. *Vaccine*, v.32, p. 1287–95, 2014.
- FERRER L. *et al.* Evaluation of the specific immune response in dogs infected by *Leishmania infantum*. In: Thoday KL, Foil CS, Bond R, Editors. *Adv Vet Dermatol*, Blackwell Science Oxford, v.4, p. 92–99, 2002.
- FERRER L. *et al.* Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *The Veterinary Record*, v. 136, p. 514-516, 1995.
- FIGUEIREDO M.J.F.M. *et al.* Fatores de risco e classificação clínica associados a soropositividade para leishmaniose visceral canina. *Ciencia Animal*, v. 15, p. 102- 106, 2014.
- FIGUEIREDO M.M. *et al.* Improved performance of ELISA and immunochromatographic tests using a new chimeric A2-based protein for human visceral leishmaniasis diagnosis. *J Immunol Res*. v. 2021, P. 5568077, 2021.
- FONSECA, A.M. Diagnóstico de leishmaniose visceral utilizando proteínas de *Leishmania infantum* com função desconhecida. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 2013.

- FOROUGH-PARVAR, F.; HATAM, G. Vaccines for canine leishmaniasis. *Adv Prev Med*, v. 2014, p. 1-9, 2014.
- FRAGA D.B.M. *et al.* The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. *PLoS Neglected Trop.Dis*, v. 10, p. e0004333, 2016.
- GALATI E. A. B. Morfologia e Taxonomia: Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro: fiocruz, p. 53-175, 2003.
- GALATI E.A.B. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel ER, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, v. 367 p. 23–52, 2003.
- GALPERIN M.Y.; KOONIN E.V. Conserved hypothetical' proteins: prioritization of targets for experimental study. *Nucleic Acids Res*, v. 12, p.5452-63, 2004.
- GIUNCHETTI R. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Veterinary Parasitology*, v. 271, p. 87-97, 2019.
- GIUNCHETTI R. C. *et al.* Relationship between Canine Visceral Leishmaniosis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* Burden in dermal inflammatory foci. *Journal of Comparative Pathology*, v. 135, p. 100-107, 2006.
- GOLDBERG D.E. Hemoglobin degradation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, v. 295, p. 275–291, 2005.
- GONÇALVES A.A.M. *et al.* Uma visão geral das abordagens imunoterapêuticas contra a leishmaniose visceral canina: o que foi testado em cães e uma nova perspectiva para melhorar a eficácia do tratamento. *Front Cell Infect Microbiol*, v. 9, p. 427, 2019.
- GONGORA R. *et al.* Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomedica*, v.23, p.153-60, 2003.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. bras. Epidemiol*, v. 7, 2004.
- GOPFERT U. *et al.* Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Molecular cloning and characterization of the *Leishmania mexicana* ppg2 gene encoding the proteophosphoglycans aPPG and pPPG2 that are secreted by amastigotes and promastigotes. *The Biochemical journal*, v. 344, p. 787795, 1999.
- GOTO H.; LINDOSO J.A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 8, p. 419433, 2010.

- GRADONI L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. *Vet Parasitol.* v. 208, P. :94–100, 2015.
- GRIMALDI G. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* v. 106, p. 54–59, 2012.
- GRIMALDI G. *et al.* The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. *The American journal of tropical medicine and hygiene,* v. 86, p. 966-971, 2012.
- GUPTA, S.K. *et al.* Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *Proteomics,* v.7, p.816-823, 2007.
- HANNAN K. M.; E. Dysregulation of RNA polymerase I transcription during disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms,* v.1829, p.342-360, 2013.
- HAYNES P.A. YATES J.R. Proteome profiling-pitfalls and progress. *Yeast,* v. 30, p. 81-7, 2000.
- HERWALDT B.L. Leishmaniasis. *Lancet,* v. 354, p. 1191-9, 1999.
- HOMMA A. *et al.* Technological development: a weak link in vaccine innovation in Brazil. *História, Ciências, Saúde. Manguinhos,* v. 10, p. 671– 96, 2003.
- KAR, K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. *Critical Reviews In Microbiology,* v. 21, p. 123-152, 1995.
- KARP G. *et al.* *Molekulare Zellbiologie.* Springer. ISBN, v. 978, p. 23857-7, 2005.
- KASSA M. *et al.* Diagnostic accuracy of direct agglutination test, rK39 ELISA and six rapid diagnostic tests among visceral leishmaniasis patients with and without HIV coinfection in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.* v. 14, P. e0008963, 2020.
- KHADEMVATAN S. *et al.* Cytotoxic Activity of *Holothuria leucospilota* Extract against *Leishmania infantum* In Vitro. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences,* v. 2016, 2016.
- KRAWCZAK F.S. *et al.*, *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil. *Journal of Medical Entomology,* v. 52, p 28-37, 2015.
- KUMAR V.D. *et al* New insights into the diagnosis and chemotherapy for visceral leishmaniasis, *Curr. Drug Deliv,* v. 11, p. 200–213, 2014.
- KUMAR, R. *et al.* Evaluation of Ex Vivo Human Immune Response against Candidate Antigens for a Visceral Leishmaniasis Vaccine. *Am J Trop Med Hyg,* v. 82, p. 808– 813, 2010.
- LAGE D. P. *et al.* A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant *Leishmania* hypothetical protein. *Immunobiology,* v. 224, p. 477-484, 2019.
- LAGE D.P. *et al.* A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its nondescribed specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis,

Parasitol. Res, v. 115, p. 1649–1658, 2016. LAGE D.P. *et al.* Crossprotective efficacy of *Leishmania infantum* LiHyD protein against tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* species. *Acta Trop*, v.158, p. 220–30, 2016.

LAGE D.P. *et al.* Prophylactic properties of a *Leishmania*-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*. V. 37, p. 646-56, 2015.

LAGE D.P. *et al.* Screening diagnostic candidates from *Leishmania infantum* proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach, *Parasitology*, v. 146, p. 1467–1476, 2019.

LAINSON R. *et al.* American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 81, p. 517, 1987.

LAINSON R.; SHAW J.J. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology*. 10th ed. London: Hodder Arnold ASM Press, p. 313-49, 2005.

LANYON S. R. *et al.* Pooling serum to identify cohorts of nonmilking cattle likely to be infected with bovine viral diarrhoea virus by testing for specific antibodies. *J Vet Diagnostic Investig*. v. 26, p. 346–53. 2014.

LARSEN J.E.P. *et al.* Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*, v. 24, 2006.

LAURENTI M. D. *et al.* Veterinary Parasitology Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 205, p. 444–450, 2014.

LAURENTI, M. D. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* to the natural vector. *Veterinary Parasitology (Print)*, v. 196, p. 296-300, 2013.

LEWIS T.S. *et al.* Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol Cell*, v. 6, p. 1343-1354, 2000.

LIMA L.V.D.R. *et al.* Further evidence associating IgG1, but not IgG2, with susceptibility to canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*-infection. *Parasite*, v. 24, p. 37, 2017.

LIMA M.P. *et al.* Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitol Res*, v. 116, p. 1197-1206, 2017.

LIRA R.A. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIEleishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniosevisceralcanina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol*, v. 137, p. 11–16, 2006.

- LOPES, E.G.P. *et al.* Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte – MG, 1993 a 2007. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.62, p.1062-1071, 2010.
- LOPEZ M. *et al.* Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 49, p. 348-356, 1993.
- LUDUEÑA R.F. Uma hipótese sobre a origem e evolução da tubulina. Int. Rev. Cell Mol. Biol, v. 302, p. 41 – 185, 2013.
- MABEY D. *et al.* Diagnostics for the developing world. Nat Rev Microbiol, v. 2, p. 231-40, 2004.
- MACHADO A. S. *et al.* An immunoproteomics approach to identify Leishmania infantum proteins to be applied for the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection. Parasitology, v. 147, p. 932-939, 2020.
- MACHADO A.S. *et al.* A Leishmania infantum hypothetical protein evaluated as a recombinant protein and specific B-cell epitope for the serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. Acta Trop, v. 203, p. 105-318, 2020.
- MACHADO J.M. *et al.* Diagnostic markers selected by immunoproteomics and phage display applied for the serodiagnosis of canine leishmaniosis, Res. Vet. Sci. v. 126, p. 4–8, 2019.
- MAGALHÃES F.B. *et al.* Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis, PloS One, v.12, p. e0184867, 2017.
- MAGALHAES R. D. M. *et al.* Identification of Differentially Expressed Proteins from Leishmania amazonensis Associated with the Loss of Virulence of the parasites. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 8, p. e2764, 2014.
- MANCIANTI F. *et al.* Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dotELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. Vet. Parasitol, v. 65, p. 1-9, 1996.
- MANUAL de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 122p.
- MARINHO, D. S. *et al.* Health economic evaluations of visceral leishmaniasis treatments: a systematic review. PLoSNegl. Trop. Dis. v. 9, 2015.
- MARTINS V.T. *et al.* Antigenicity and protective efficacy of a Leishmania amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. PLoS neglected tropical diseases, v. 7, p. 21-48, 2013.
- MATIAS E.P *et al.* Efeitos adversos da vacina leish-tec® em cães soronegativos para leishmaniose visceral/adverse effects of leish-tec® vaccine on seronegative dogs for visceral leishmaniasis. Brazilian Journal of Development. V. 6, 2020.

- MATRANGOLO F.S. *et al.* Comparative proteomic analysis of antimonyresistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 190, p. 63-75, 2013.
- MCKERROW J.H. Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol*, v.1, p. 497–536, 2006.
- MELÉNDEZ-LAZO A. *et al.* Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Res Vet Sci*, v.117, p.18-27, 2018.
- MELO M.N. *et al.* Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. *Revista Brasileira Parasitologia*, v. 7, 2004.
- MENEZES-SOUZA D, *et al.* Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, v. 21, p. 949959, 2014.
- MENEZES-SOUZA D. *et al.* Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *PloS one*, v. 9, p. 99-216, 2014.
- MENEZES-SOUZA D. *et al.* Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. *Veterinary Parasitology (Print)*, v. 177, p. 39-49, 2011.
- METTLER M. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 5515-5519, 2005.
- MIRÓ G., *et al.* Novel areas for prevention and control of canine leishmaniosis. *Trends Parasitol.* v. 33, P. 718– 730, 2017.
- MOHAPATRA T.M. *et al.* Compararative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* v. 4, P.114– 7, 2010.
- MOHEBALI M, KESHAVARZ H, SHIRMOHAMMAD S, AKHOUNDI B, BORJIAN A, HASSANPOUR G, MAMISHI S, MAHMOUDI S. The diagnostic accuracy of the direct agglutination test for serodiagnosis of human visceral leishmaniasis: a systematic review with meta-analysis. *BMC Infect Dis.*20:946, 2020.
- MORENO J. & ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitol*, v. 18, p. 399-405, 2002.
- MORENO J., *et al.* Use of a LIESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis.*v. 6, P. 1683, 2012.

- MUTISO, J. M. *et al.* Development of Leishmania vaccines: predicting the future from past and present experience. *J Biomed Res.*, v. 27, p. 85–102, 2013.
- NAKAMURA K., *et al.* Analysis of tubulin isoforms by two-dimensional gel electrophoresis using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the first dimension. *Journal of biochemical and biophysical methods*, v. 24, p. 195203, 1992.
- NEUHOFF V. *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v.9, p.255-262. 1988.
- NEVES D. P. *Parasitologia Humana*. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.
- NICOLATO R.D.C. *et al.* Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally Leishmania infantum infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One*, v.8, 2013.
- NOAZIN S. *et al.* First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. *Vaccine*, v. 26, p. 6759–6767, 2008.
- NOGALES E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem*, v. 69, p. 277-302, 2000.
- OLIVA G, *et al.* A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two Leishmania infantum transmission seasons. *PLoS Negl Trop Dis*. v. 8, P. 3213, 2014.
- OLIVA, G. *et al.* Incidence and time course of Leishmania infantum infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of clinical microbiology*, v. 44, p. 13181322, 2006.
- OLIVEIRA-DA-SILVA J.A. *et al.* Biotechnological applications from a Leishmania amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral leishmaniasis. *Microbial pathogenesis*, v. 147, p. 104283, 2020.
- ORDEIX L. *et al.* Histological and parasitological distinctive findings in clinically lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. *Parasit Vectors*, v. 10, 2017.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniasis. Disponível em:
<<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em abril 2020.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas. N° 6 2018.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO

- PANAMERICANA DE SAÚDE. Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas. 2017 - 2022. 2017.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. N° 5. 2017.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: LEISHMANIOSES: INFORME EPIDEMIOLÓGICO NAS AMÉRICAS: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis, 2018.
- PACE D. Leishmaniasis. *J Infect*, v. 1, p.10-18, 2014.
- PALATNIK-DE-SOUSA C. B. Nucleoside hydrolase NH 36: A vital enzyme for the *Leishmania* genus in the development of T-cell epitope crossprotective vaccines. *Front Immunol*, v. 10, 2019.
- PALATNIK-DE-SOUSA C.B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, v. 25, p. 1709-24, 2008.
- PALTRINIERI S. *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, v. 236, p. 1184-1191, 2010. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Epidemiological Report of the Americas. Leishmaniasis Report, v.6, 2018.
- PEACOCK C.S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*, v. 39, p. 839-847, 2007.
- POINAR G.O. JR. POINAR R. Fossil evidence of insect pathogens. *J Invertebr Pathol*, v. 89, p. 243–250, 2004.
- QUEIROZ N.M. *et al.* Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA test. *Rev Bras Parasitol Vet.*, v.19, p.32-8, 2010.
- QUIJADA L. *et al.* Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunol lett*, v. 52, p. 73-9, 1996.
- QUIÑONES W. *et al.* *Leishmania mexicana*: Molecular cloning and characterization of enolase. *Exp Parasitol*, v. 116, p. 241–51, 2007. RAPPUOLI R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*, v. 19, p. 2688–2691, 2001.
- RASKIN, K. B.; BELDNER, S. Clinical examination of the distal ulna and surrounding structures. *Hand Clinics*, v. 14, p. 177-190. 1998.
- REAL F. *et al.* The Genome Sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional Annotation and Extended Analysis of Gene Models. *DNA research*, v. 20, p. 567-81, 2013.
- RECHE P. A. & REINHERZ E. L. Prediction of peptide-MHC binding using profiles. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 409, p. 185–200, 2007.

- REGINA-SILVA S. *et al.* Field randomized trial to evaluate the efficacy of the LeishTec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*, v. 34, p. 2233–9, 2016.
- REIS, A. B. *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 128, p. 8795, 2009.
- REIS, A. B. *et al.* Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*, v. 26, p. 341–9, 2010.
- REITHINGER R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, v. 7, p.581–596, 2007.
- RESENDE L. A. *et al.* In vitro infectivity of the strains isolated from dogs naturally infected with *Leishmania infantum* present a distinct pathogenic profile in hamsters. *Frontiers in medicine*, v. 1, p. 1-5, 2020.
- REZAEI Z. *et al.* Importance of *L. infantum* H2b recombinant antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Iran J Immunol.* v.;16, P. 311–320, 2019.
- RIBEIRO P.A.F. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a new *Leishmania* hypothetical protein applied as a DNA vaccine or in a recombinant form against *Leishmania infantum* infection. *Mol Immunol*, v. 106, p. 108-118, 2019.
- RIBEIRO R.R. *et al.* Leishmaniose canina: uma visão geral do estado atual e estratégias de controle. *BioMed Res.* 2018.
- RODRIGUES M. R. *et al.* Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope. *Journal of Immunological Methods*, v. 474, p. 112641, 2019.
- RODRIGUES M.R. *et al.* Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope. *J Immunol Methods*, v. 474, p. 112-641, 2019.
- ROMERO G, BOELAERT M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 4, p. 5-84, 2010.
- ROSS R. Further Notes on Leishman's Bodies. *British medical journal*, v. 2, p.1401, 1903.
- SAF'JANOVA V.M. Classification of the genus *Leishmania* Ross. Chapter 11
(in Russian). In *The Leishmaniasis. Protozoology*, Academy of Sciences, USSR All Union Society of Protozoologists, Lennigrad, v. 7, p. 95-101, 1982.
- SAJID M. *et al.* Proteases of parasitic protozoa - current status and validation. In: Selzer P, editor. *Drug Discovery in Infectious Diseases: From Drug Targets to Drug Candidates*. Wiley-VCH Verlag, p. 177–208, 2009.
- SALLES B C.S. *et al.* application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its lineares B-cell epitope for the

- serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis, *Immunobiology*, v. 224, p. 163–171, 2019.
- SANTOS T.T.O. *et al.* Probing the efficacy of a heterologous *Leishmania/L. Viannia braziliensis* recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of *L. infantum* in BALB/c mice. *Acta Trop*, v. 171, p. 8-16, 2017.
- SANTOS W.J.T. *et al.* Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. v. 14, P. e0008488, 2020.
- SANTOS, T. T.O. *et al.* Recombinant *Leishmania* eukaryotic elongation factor-1 beta protein: A potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans. *Microbial pathogenesis*, v. 137, p. 103783, 2019.
- SCALONE A. *et al.* Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme- linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, v. 104, p. 275-285, 2002.
- SCHÖNIAN G. *et al.* Is it time to revise the Van der Auwera and Dujardin 286 cmr.asm.org *Clinical Microbiology Reviews* April 2015 Volume 28 Number 2 nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*, v. 26, p. 466 – 469, 2010.
- SELVAPANDIYAN A. *et al.* Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites. *J Trop Med*, v. 2012, 2012.
- SILVA R. S. Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec® (Hertape Saúde Animal S/A) para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). 85 f. Pós-graduação (tese) - Ciências da saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte. 2015.
- SILVA, D. A. *et al.* Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Veterinary parasitology*, v. 179, p. 257-261, 2011.
- SILVA, D. M. Leishmaniose Visceral Canina: Análise do valor preditivo positivo da combinação dos testes diagnósticos DPP e ELISA em cães submetidos a eutanásia no Controle de Zoonoses do Distrito Federal. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2015
- SILVA, F.T.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*. v.1, n.1, p.20. 2007.
- SILVEIRA F.T *et al.* Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. *Revista Paraense de Medicina*, v. 22, p. 9-20, 2008.

- SINGH, O. P.; SUNDAR S. Developments in diagnosis of visceral leishmaniasis in the elimination era. *Journal of parasitology research*, v. 2015, 2015.
- SIVASHANKARI S.; SHANMUGHAVEL P. Functional annotation of hypothetical proteins - A review. *Bioinformation*, v. 29, p. 335-8, 2006.
- SOLANO-GALLEGO L *et al.* Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol*, v. 19, p. 265-76, 2001.
- SOLANO-GALLEGO L, *et al.* Diagnostic challenges in the era of canine Leishmania infantum vaccines. *Trends Parasitol*. v. 33, P. 706–17, 2017.
- SOLANO-GALLEGO L, *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors*, v. 4, p. 86, 2011.
- SOLANO-GALLEGO L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, v. 165, p. 1- 18, 2009.
- SRIVASTAVA S. *et al.* Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 9, p. 277, 2016.
- SRIVIDYA G. *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res.* v. 110, P.1065–1078, 2012.
- STARITA C., GAVAZZA A., LUBAS G. Hematological, biochemical, and serological findings in healthy canine blood donors after the administration of CaniLeish® vaccine. *Vet Med Int*. v. 2016. P. 4601893. 2016.
- STEEL L.F. *et al.* Methods of comparative proteomic profiling for disease diagnostics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 5, p. 27584, 2005.
- STEVERDING D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 82, 2017.
- SUDARSHAN M. *et al.* Quantitative PCR in epidemiology for early detection of visceral leishmaniasis cases in India. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 8, p. 33-66, 2014.
- SUNDAR S. *et al.* Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop Med Int Health*, v.12, p. 284-289, 2007.
- TAFURI W.L. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*, v. 96, p. 203-212, 2001.
- TAKAGI H., *et al.* Short report: production of recombinant kinesin-related protein of Leishmania donovani and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. v. 76, P.902–905, 2007.
- TÁVORA L.G., NOGUEIRA M.B., GOMES S.T. Visceral leishmaniasis/HIV coinfection in northeast Brazil: evaluation of outcome. *Braz J Infect Dis*.v. 19, P.651– 656, 2015.

- TEIXEIRA A.I.P. *et al.* Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 114, p. 180-452, 2019.
- TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?. *Am J Trop Med Hyg.* v. 52, p. 287-92. 1995.
- TESTASICCA M. C. *et al.* Antibody responses induced by Leish-Tec®, na A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. *Vet Parasitol*, v. 29, p. 169–176, 2014.
- TEWARY P. *et al.* Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen. *Vaccine*, v. 22, p. 3053–3060, 2004.
- THOMAZ-SOCCOL V. *et al.* Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum Comp*, v. 68, p. 107–108, 1993.
- TJALSMA H. *et al.* Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications. *Proteomics Clin Appl*, v. 2, p.167-80, 2008.
- TRAVI B.L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl TropDis*, v.12, p. e0006082, 2018.
- TUSZYNSKI G.P. *et al.* A two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) system using sodium dodecyl sulfate-PAGE in the first dimension. *Analytical biochemistry*, v. 93, p. 329-338, 1979.
- VALE D. L. *et al.* Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, v.95, p. 134–143, 2019.
- VALE E. C. S.; FURTADO T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *An Bras Dermatol.*, v. 80, p. 4218, 2005.
- VAN DER AUWERA G.; DUJARDIN J.C. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Ver*, v. 28, p. 265- 294, 2015.
- VIANA K.F., *et al.* Application of rapid in vitro co-culture system of macrophages and T-cell subsets to assess the immunogenicity of dogs vaccinated with live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites (LdCen^{-/-}). *Parasites Vectors.* v. 9, P.1. 2016.
- VIOL M. A. *et al.* Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *Parasitology research*, v. 111, p. 1607-1613, 2012.
- WEIGLE K.A. *et al.* Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg*, v.36, p. 489-496, 1987.

WERNECK G.L. *et al.* Effectiveness of Insecticide Spraying and Culling of

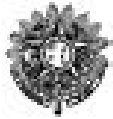
Dogs on the Incidence of *Leishmania infantum* Infection in Humans: A Cluster Randomized Trial in Teresina, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, 2014.

WHO, World Health Organization. Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap. v. 35, 96, P. 401-419, 2021.

WHO, World Health Organization. Leishmaniasis. 2017. Available at:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

YISASCHAR-MEKUZAS Y. *et al.* Identification of *Babesia* species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, and evaluation of coinfection by other vector-borne pathogens. *Veterinary Parasitology*. v. 191, P. 367373, 2013.

10 ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICES-Il, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1369 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



OFÍCIO CEUA Nº. 52/2014, de 30 de junho de 2014.

Ilustríssimo Senhor

Professor Doutor Alexandre Barbosa Reis

DEACL/EFAR/UFOP

Senhor Pesquisador,

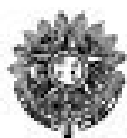
Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo "Análise multiparamétrica como plataforma de testes de Imunoquimioterápicos para a Leishmaniose Visceral".

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICIEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3550-1368 Fax (31) 3550-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2014/10, intitulado "Análise multiparamétrica como plataforma de testes de Imunoquimioterápicos para a Leishmaniose Visceral", que tem como responsável o/a Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 31/03/2017.

Ouro Preto, 30 de junho de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP