

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

Beatriz Cristina Silveira Salles

Mimotopos de *Leishmania*
infantum e fago-ELISA como
ferramentas para um
sorodiagnóstico sensível e
específico da leishmaniose
visceral humana

Belo Horizonte
Outubro de 2017

**Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical**

Beatriz Cristina Silveira Salles

Mimotopos de *Leishmania infantum* e fago-ELISA como ferramentas para um sorodiagnóstico sensível e específico da leishmaniose visceral humana

Tese 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 parcial para a obtenção do título de Doutor junto ao referido programa

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - UFMG
Co-orientadora: Dra. Lourena Emanuele Costa - UFMG

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Outubro de 2017

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

Reitor: **Prof. Jaime Arturo Ramírez**

Vice-Reitora: **Profa. Sandra Regina Goulart Almeida**

Pró-Reitor de Pós-Graduação: **Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira**

Pró-Reitora de Pesquisa: **Prof. Ado Jório de Vasconcelos**

Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Tarcizo Afonso Nunes**

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Humberto José Alves**

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Luiz Armando Cunha de Marco**

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Selmo Geber**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: **Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho**

Vice Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: **Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro**

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical:

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Profa. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Prof. Unai Tupinambás

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

Beatriz Cristina Silveira Salles – Representante Discente

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho

*Ao meu pai, Antônio Salles Filho, à minha mãe, Nilda M. Silveira Salles,
às minhas irmãs, Ana Gabriela Silveira Salles e Giovana L. Silveira Salles,
pelo apoio, confiança e palavras de incentivo que me mostraram a
importância da resiliência e persistência.*

*Ao Samuel S. Laia, pelo conforto e otimismo, que me
incendiaram de coragem.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os envolvidos neste trabalho por realizarem suas atividades com ética e competência, em especial, ao prof. Eduardo A. Ferraz Coelho, por ter sido a luz no fim do túnel ...
minha gratidão é perene.

EPÍGRAFE



RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antropozoonose considerada como uma importante doença tropical em vários países no mundo. Como a apresentação clínica da LV não possui alta especificidade, dificultando seu diagnóstico, testes laboratoriais são necessários para a confirmação da infecção e o estabelecimento do tratamento adequado. Seu diagnóstico deve possuir alta sensibilidade e especificidade, uma vez que a LV é fatal quando aguda e não tratada e porque o tratamento atualmente disponível apresenta elevada toxicidade e/ou alto custo. Os métodos sorológicos utilizados para diagnosticar LV são considerados minimamente invasivos, mas as limitações incluem a identificação de anticorpos em pacientes tratados e curados, mesmo após longos períodos de tempo, reações cruzadas com outras doenças relacionadas à LV e baixa sensibilidade em pacientes assintomáticos. Assim, a busca por novos antígenos capazes de superar tais limitações nos testes sorológicos é necessária. Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar epítomos fundidos com bacteriófagos (mimotopos) para serem utilizados no sorodiagnóstico da LV. Para tal, foram selecionados clones de bacteriófagos que expressam peptídeos exógenos de interesse contra anticorpos de indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas e não endêmicas de LV, de pacientes com doença de Chagas e de pacientes com LV. Oito clones de fagos expressando mimotopos de interesse foram selecionados após os ciclos de bio-panning, e sua reatividade contra um painel sorológico foi avaliada em um teste de fago-ELISA. Um fago tipo selvagem, sem o péptido exógeno e o teste imunocromatográfico baseado na proteína recombinante K39 foram utilizados como controles. Os resultados demonstram que os oito clones apresentaram excelente desempenho para identificar sorologicamente pacientes com LV, apresentando elevado grau de sensibilidade e especificidade. Portanto, o presente trabalho apresenta novos antígenos que podem vir a ser utilizados no sorodiagnóstico específico e sensível da LV humana.

Palavras-chave: Fago-ELISA; mimotopos; sorodiagnóstico; leishmaniose visceral; *Phage display*; especificidade.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is an anthroponosis that represents one of the biggest public health problems in the world. As the clinical presentation of VL lacks specificity, laboratory testing is necessary for confirmation of infection and establishment of appropriate treatment. Its diagnosis must have a high sensitivity and specificity (> 95%) as VL is fatal and because the treatments currently available present a high toxicity. The serological methods used to diagnose VL are minimally invasive, but currently available limitations include identifying antibodies in treated patients even after long periods of time and not identifying patients with relapses. Thus, the search for new antigens capable of overcoming the limitations of current serological tests is relevant. Thus, the objective of this study was to select fused epitopes with bacteriophages to be used in the serodiagnosis of human VL. In this work, clones of bacteriophages expressing exogenous peptides of interest were selected against antibodies from healthy individuals living in endemic and non-endemic areas for VL, from patients with Chagas' disease and from people with active VL. Eight phage clones were selected after the cycles of bio-panning, and their reactivity against a human serological panel was evaluated in a phage-ELISA assay. The wild-type phage (without the exogenous peptide) and the immunochromatographic test based on the K39 recombinant protein were used as controls. The results demonstrate that all eight clones showed an excellent performance to serologically identify patients with VL of the other groups analyzed. Therefore, new antigens potentially capable of being used in a highly specific and sensitive serodiagnosis for VL were found.

Keywords: Phage-ELISA; mimotopes; serodiagnosis; human visceral leishmaniasis; *Phage display*; specificity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i>	- 17 -
Figura 2. Fluxograma mostrando as principais etapas do trabalho.....	- 27 -
Figura 3. Metodologia de acoplamento das microesferas magnéticas com anticorpos IgGs	- 30 -
Figura 4. Representação do processo de bio-panning.	- 32 -
Figura 5. Reatividade dos clones de fagos por um fago-ELISA.	- 44 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos peptídeos selecionados.....	- 37 -
Tabela 2. Alinhamento de sequência de peptídeos selecionados.	- 38 -
Tabela 3. Alinhamento local básico para o epitopo de consenso.	- 38 -
Tabela 4. Alinhamento local básico para cada epitopo dos clones.....	- 39 -
Tabela 5. Avaliação diagnóstica dos clones de fagos.....	- 41 -
Tabela 6. Desempenho diagnóstico dos clones de fagos.	- 42 -

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL	16
2.2	PATOLOGIA	18
2.3	DIAGNOSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL	20
2.4	<i>PHAGE DISPLAY</i>	22
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.2	ASPECTOS ETICOS	28
4.3	PREPARAÇÃO DO EXTRATO SOLÚVEL DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	28
4.4	AMOSTRAS DE SORO	28
4.5	PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS IgGs	29
4.6	<i>PHAGE DISPLAY</i>	30
4.7	EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES SELECIONADOS	32
4.8	BIOINFORMÁTICA	33
4.9	FAGO-ELISA	33
4.10	ELISA PARA SORODIAGNOSTICO DA LV HUMANA	34
4.11	TESTE RÁPIDO KALAZAR DETECT™	34
4.12	ANALISES ESTATÍSTICAS	35
5	RESULTADOS	36
5.1	SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS ESPECÍFICOS	36
5.2	DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DOS CLONES SELECIONADOS	40
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	51
8	PERSPECTIVAS	52
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
10	ANEXOS	63

10.1	REGISTRO NO COMITÉ DE ETICA EM PESQUISA DA UFMG -----	63 -
10.2	REGISTRO DE PATENTE DEPOSITADA DOS MIMOTOPOS-----	65 -
10.3	ARTIGO PUBLICADO COM OS DADOS DA TESE -----	66 -

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*. Elas são distribuídas pelo mundo em regiões tropicais e subtropicais em 98 países, sendo que 90% dos casos relatados ocorrem no Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão, Sudão do Sul e Síria. As leishmanioses estão divididas de acordo com a sua manifestação clínica nas formas tegumentar e visceral (WHO, 2016; Chappuis, *et al*, 2007). Em ambas as formas da doença, os protozoários infectam células do sistema fagocítico mononuclear, sendo que as espécies *L. infantum* e *L. donovani* são os principais agentes etiológicos da leishmaniose visceral (LV), sendo encontrados parasitando macrófagos do fígado, baço, medula óssea e linfonodos dos pacientes, enquanto que a leishmaniose tegumentar (LT) é causada principalmente pelas espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* nas Américas, e se reproduzem dentro de macrófagos residentes na pele e/ou das mucosas da nasofaringe. Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas ao ser humano pela picada do inseto vetor fêmea da família Phlebotomidae (De Pablos, *et al*, 2016; Harhay, *et al*, 2011; Kaye & Scott, 2011).

Dentre as leishmanioses, a LV é a que apresenta maior mortalidade sendo considerada como a forma mais grave da infecção. Na América Latina, onde o agente etiológico é a *L. infantum*, o número de casos a despeito das ações de controle tem aumentado nos últimos anos. De acordo com o último boletim para as leishmanioses nas Américas da Organização Mundial da Saúde (2017), entre 2001 e 2015, 52.176 casos de LV foram registrados no Continente, com uma média de aproximadamente 3.478 casos por ano. O Brasil, onde a transmissão da LV se encontra em expansão, é responsável por 96% de todos os casos reportados. Em 2015, 3.289 foram relatados em nosso país. O Paraguai está em segundo lugar, com 92 registros de LV em 2015. Na Venezuela e Honduras, houve aumento de até quatro vezes no número de casos entre 2014 e 2015. A taxa de mortalidade para a LV também tem

aumentado nos últimos anos, em 2012 era de 6.5%, cerca de 180 mortes, passando, em 2015, para 7,7%, 268 mortes, destas 251 ocorreram no Brasil, 9 na Venezuela e 8 no Paraguai (WHO/PAHO, 2017).

Dado o panorama da LV nas Américas, o estabelecimento de medidas eficientes para o controle da transmissão do parasito, a identificação e o tratamento das pessoas infectadas são condições necessárias para se reverter tal quadro epidemiológico. Apesar das melhorias na capacitação dos agentes de saúde com cursos sobre a LV e a implementação de novas tecnologias para o tratamento da doença e melhoria dos testes diagnósticos rápidos, tais ações ainda não se apresentam eficazes para controlar a disseminação da doença em nosso país. Sendo assim, novas estratégias e ações específicas devem ser desenvolvidas, de modo que os profissionais de saúde estejam aptos a identificar os casos aos primeiros sinais clínicos e realizar o diagnóstico de forma rápida, precisa, evitando assim maiores complicações.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo buscar melhorias nas condições diagnósticas da LV no Brasil, por meio da identificação de novos antígenos, representados por peptídeos expressos na superfície de clones de bacteriófagos, que foram reconhecidos com alta sensibilidade e especificidade por anticorpos presentes nos soros de pacientes com LV por meio da tecnologia do *Phage display*, para serem utilizados no diagnóstico laboratorial da doença. Os fagos com peptídeos capazes de ser reconhecidos de maneira específica por anticorpos de pacientes com LV foram triados por meio de ciclos de bio-panning, isolados e usados por meio de uma técnica de fago-ELISA como antígenos frente a diferentes classes de soros (Costa, *et al.*, 2017; Coelho, *et al.*, 2015; Costa, *et al.*, 2014). A partir dessa técnica, encontramos oito sequências de aminoácidos, denominadas de mimotopos, com potencial para serem usados na confecção de um teste rápido de sorodiagnóstico da LV com alta sensibilidade e especificidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária causada por infecção pelo complexo *Leishmania donovani* em países tropicais e subtropicais do mundo. A forma promastigota do parasito é transmitida ao hospedeiro mamífero, como humanos e cães, pela picada do inseto fêmea do gênero *Phlebotominae* (WHO, 2016; Chappuis, *et al*, 2007). Uma vez inoculados, os parasitos podem ser internalizados por fagócitos mononucleares onde se multiplicam como formas amastigotas. Eles rompem a célula hospedeira e infectam outras células, espalhando-se através dos sistemas vascular e linfático, infiltrando o baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Parasitos são então ingeridos pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo, onde as amastigotas se transformam em formas promastigotas, desenvolvem-se no intestino médio e migram para a probóscide do inseto, onde são injetadas novamente em outro hospedeiro mamífero (Fig. 1) (De Pablos, *et al*, 2016; Harhay, *et al*, 2011; Kaye & Scott, 2011; Chappuis, *et al*, 2007; Handman, *et al* 2001).

No Brasil, a LV é uma antropozoonose considerada uma doença tropical negligenciada e causada por *L. infantum*. São descritos dois ciclos de LV, um silvestre e outro doméstico, e a transmissão para raposas selvagens, cães e humanos é realizada pelas espécies de vetores *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruz* (Laison & Rangel, 2005; Laison, 1983).

Como relatado por Conti e colaboradores, em 2016, o ciclo doméstico e urbanização da LV se tornaram evidentes e um grave problema de saúde pública no Brasil durante a década de 1950, com o movimento de imigração das populações rurais para áreas urbanas. Essas populações se estabeleceram em regiões com poucas condições de saneamento, favorecendo o estabelecimento do ciclo da doença nas médias e grandes cidades. Aliado a este fato, políticas públicas visando o controle da doença foram ineficazes, tornando a LV um grave problema social e de saúde em nosso país. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2014, 3.453

casos de LV foram relatados no Brasil e a taxa de mortalidade foi de 7%, a maior entre os 25 países pesquisados pela organização. No mesmo relatório, 43% da população do país estavam sob o risco de infecção (WHO, 2017-2016). Além desses dados, vale a pena mencionar que a presença de um parente com a forma ativa de LV está associada a um aumento no número de pessoas com sorologia positiva para *Leishmania* (Dupnik, *et al*, 2011) e que as populações que vivem nas mesmas condições de habitação, saneamento e ambientais como aquelas com LV apresentam uma alta porcentagem de reatividade aos antígenos parasitários (Moura, *et al*, 2012).

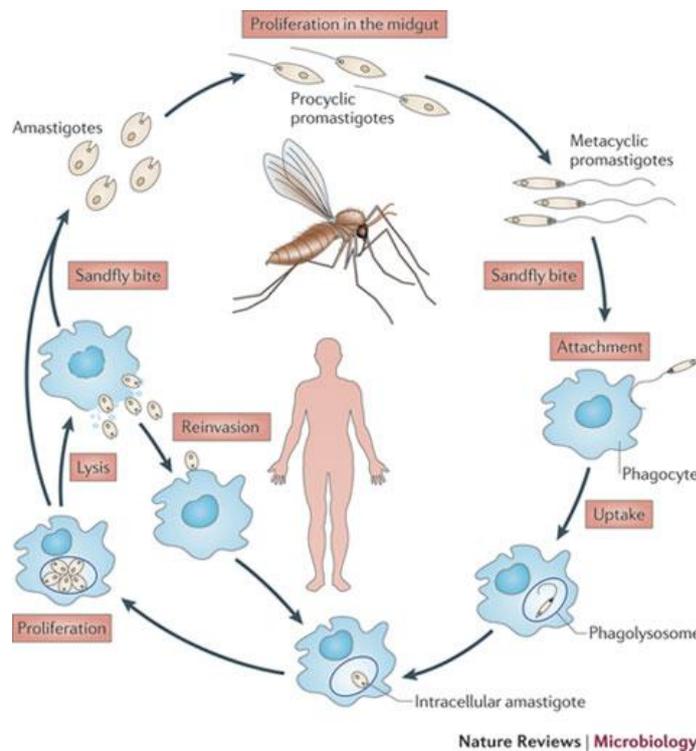


Figura 1. O ciclo biológico do parasito *Leishmania*. As formas promastigotas pró-cíclicas de *Leishmania* sofrem diferenciação, no interior do inseto vetor, em promastigotas metacíclicas infectantes. Durante a alimentação do sangue, o vetor regurgita as promastigotas metacíclicas. Elas são fagocitadas por um dos vários tipos de células possíveis que são encontrados no ambiente local. Após se estabelecer no interior celular, as promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas, formas sem flagelo aparente. As amastigotas sofrem replicação dentro das células hospedeiras, que se rompem quando há muitos parasitos presentes, permitindo a reinfeção de fagócitos locais. O ciclo da transmissão está completo quando os fagócitos infectados são ingeridos por outro inseto juntamente com o sangue. As amastigotas ingeridas se transformam em promastigotas no intestino médio do vetor. Fonte: Kaye & Scott, 2011.

2.2 PATOLOGIA

Quando da infecção por *Leishmania infantum*, as formas promastigostas metacíclicas são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear, tais como monócitos, neutrófilos e células dendríticas. Nos neutrófilos, primeira célula do sistema inume a chegar no local da inoculação, o parasito desencadeia a apoptose celular e é ingerido por macrófagos. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados não produz ativação dos macrófagos, e o parasito encontra no fago lisossomo um local para se diferenciar em amastigota e iniciar sua replicação por divisão binária. Essa ação do neutrófilo como um “cavalo-de-troia” levando o protozoário para o interior do macrófago está relacionada à transferência da carga parasitária da primeira célula para a última, além disso, a fagocitose da *Leishmania* impede a lise dela pelo sistema do complemento (Kaye & Scott, 2011; Thalhoffer *et al.*, 2011; Peters & Sacks, 2009).

Os fatores que influenciam na sobrevivência do parasito no interior do vacúolo fagocítico ainda não são totalmente esclarecidos. Porém, pode-se citar alguns fatos relacionados. A utilização do receptor do complemento 3 (CR3) para a internalização no macrófago resulta no desarmamento da ativação na célula hospedeira (Ueno *et al.*, 2009). O maior tamanho do fagolisossomos abrigando espécies de *Leishmania* encontradas nas Américas pode reduzir o efeito dos agentes leishmanicidas sobre o parasito. O tamanho do vacúolo está relacionado com a quantidade de regulador de transito lisossomal (LYST), quanto maior a expressão dessa proteína, menor será o tamanho do vacúolo e mais susceptível o protozoário é a ação de radicais livres de oxigênio (Kaye & Scott, 2011).

Parte da população pode ser infectada e não desenvolver a doença, mesmo apresentando sorologia positiva para antígenos de *Leishmania* (Moura, *et al.*, 2012; Dupnik, *et al.*, 2011). Cerca de 20% da população infectada desenvolve sintomas de infecção sistêmica como febre, cansaço, perda de apetite, emagrecimento, anemia, evoluindo para um quadro de distensão abdominal com hepatoesplenomegalia (WHO, 2016). Esses sintomas são em decorrência do descontrole da replicação das amastigotas no interior dos macrófagos infectados. Assim, as células parasitadas são levadas a órgãos linfóides, via vasos linfáticos e sanguíneos, onde sofrem lise e liberam os

protozoários no meio intracelular de órgãos como fígado e baço onde serão fagocitados pelos macrófagos residentes, células de *Kupffer*, no primeiro, *marginal zone* (MZM) e *marginal metallophilic macrophages* (MMM) no segundo. O processo de estabelecimento da infecção nesses órgãos leva a uma alteração na morfologia e função dos tecidos acometidos provocando o aumento desses órgãos (Rodrigues *et al*, 2016; Nylén & Sacks, 2007; Stanley, Engwerda, 2007).

Como mencionado anteriormente, estudos epidemiológicos em áreas endêmicas demonstraram que um grande contingente de indivíduos está infectado com o parasito e não tem manifestação clínica aparente da doença (Moura, *et al*, 2012; Dupnik, *et al*, 2011). Esses casos estão associados a uma resposta imune celular de células T CD4⁺ Th1 ativada pela produção de interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-12 (IL-12) por células dendríticas durante a apresentação de antígenos. As células Th1 são capazes de ativar macrófagos infectados a produzir radicais livres de oxigênio levando à morte do parasito (Rodrigues, *et al.*, 2016). Em pacientes com LV, a incapacidade de controlar a infecção por *L. infantum* está relacionada a uma falta de resposta das células T aos antígenos do parasito ou na sua diferenciação em células T CD4⁺ regulatórias. Esse fato desencadeia a produção de citocinas como interleucina-4 (IL-4) e de interleucina-10 (IL-10), resultando no desenvolvimento de doença sintomática. Esse processo ocorre no baço por meio a regulação positiva de IL-10, que diminui a migração de células dendríticas e de linfócitos T para regiões de apresentação de antígeno no órgão além de causar a diferenciação de células produtoras de IL-10. Estes casos, quando não tratados, podem levar o paciente à morte (Kaye & Scott, 2011; Nylén & Sacks, 2007; Chappuis, *et al*, 2007, Stanley & Engwerda, 2007).

Na medula óssea, também acometida pela infecção, ocorre um aumento da diferenciação e liberação de monócitos imaturos em resposta a alta concentração de IL-10 produzida no órgão. Essas células imaturas funcionam como um reservatório onde as formas amastigotas passam a se reproduzir intensamente. Além disso, o aumento do número de monócitos reduz a produção de reticulócitos resultando no desenvolvimento de anemia em pacientes com LV (Stanley & Engwerda, 2007).

Considerando a alta taxa de letalidade em pacientes com LV ativa, por terem uma resposta imune com elevada produção de IL-10 e, por conta disso, serem incapazes de controlar a replicação do parasito, o tratamento contra a doença é impreterível para diminuir a carga parasitária, eliminar os sintomas e consequentemente, restaurar a saúde nesses indivíduos. O Brasil disponibiliza o diagnóstico e tratamento de forma gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS). As drogas disponíveis para rede pública são o antimonial penta valentes (Glucantime[®], Aventis), a anfotericina B livre e lipossomal (Ambisome[®], Gilead), dentre outros. Uma vez diagnosticada, o tratamento da LV dever ser iniciado o mais rápido possível, em alguns casos ele demanda internação. O fármaco de escolha deve ser determinado pelo médico de acordo com o quadro clínico do paciente e baseando-se na recomendação do Ministério da Saúde. A escolha é determinada levando-se em consideração a idade, a presença de insuficiência renal e/ou hepática e arritmias cardíacas, devido às variações no grau de toxicidade e eficácia de cada droga (Ministério da Saúde do Brasil, 2011).

2.3 DIAGNOSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O diagnóstico parasitológico da LV é considerado complexo e invasivo, sendo o padrão-ouro baseado na demonstração de formas de amastigotas do parasito por meio do exame direto no microscópico de aspirados do baço, linfonodos e/ou medula óssea dos pacientes (Srividya, *et al*, 2012). Sua especificidade é alta; no entanto, a sensibilidade é variável de acordo com a amostra coletada, sendo maior no baço (93 a 99%) do que na medula óssea (53 a 86%) ou nos linfonodos (53 a 65%) (Siddig, *et al*, 1988). Isto deve se principalmente à experiência técnica e qualidade das lâminas e reagentes preparados, que muitas vezes não estão disponíveis para estudos de campo. Assim, um técnico bem treinado e um efetivo controle de qualidade são necessários para o diagnóstico preciso da doença (Srividya, *et al*, 2012).

A intradermorreação de Montenegro não é utilizada para o diagnóstico de LV. Por estar relacionado com a resposta imune celular do hospedeiro, esse exame é sempre negativo em pacientes sintomáticos antes do tratamento e positivos após a cura do mesmo (Ministério da Saúde, 2005).

Técnicas sorológicas que pesquisam em amostras de sangue/soro dos pacientes anticorpos reativos contra antígenos de *L. infantum*, como ELISA,

IFAT, imunotransferência e teste de aglutinação direta (DAT), com base no uso de extratos de parasitos ou proteínas recombinantes derivadas deles, são técnicas utilizadas para o diagnóstico sorológico de LV. Nestes casos, existe uma vantagem na melhoria dessa condição diagnóstica, uma vez que a coleta das amostras se baseia na punção venosa para remover uma pequena alíquota de sangue, sendo considerada menos invasiva e com menos riscos para os pacientes quando comparada às biópsias. Entre os antígenos recombinantes mais conhecidos, a proteína recombinante K39 foi o antígeno mais promissor para detectar sorologicamente pacientes com LV aguda. Tal proteína é codificada pelo gene relacionado com a kinesina e contém sequências repetitivas de 39 resíduos de aminoácidos. A proteína rK39 de *L. infantum* provou ser um excelente marcador para o diagnóstico de LV usando a técnica ELISA, sendo reativa com cerca de 98% dos pacientes analisados (Badaró *et al.*, 1996). Esta proteína é, atualmente, utilizada para o sorodiagnóstico da LV em diversos países ao redor do mundo, com uma sensibilidade variando entre 95 e 100% (Singh *et al.*, 2010). O kit comercial (Dipstick rK39[®]) é um teste rápido para a detecção de LV e é recomendado pela OMS. No entanto, sua validação para a detecção de casos de infecção por *L. infantum* variou de acordo com a cepa e a cultura dos parasitos, a produção da proteína recombinante e a variabilidade clínica e sorológica dos pacientes, além da variabilidade genética observada entre diferentes estirpes da mesma espécie, especialmente ao avaliar cepas isoladas de locais distantes (Zijlstra *et al.*, 2001).

Os avanços tecnológicos levaram às melhorias no desenvolvimento de novas metodologias e ferramentas de diagnóstico, sendo considerados úteis para uma avaliação rápida e precisa, além de permitir o desenho racional de estratégias efetivas de controle de doenças. A necessidade de desenvolver ferramentas de diagnóstico que possam identificar e distinguir pacientes com doença assintomática, daqueles com a doença ativa ou indivíduos curados, e pacientes com outras infecções, continua a ser a principal busca para melhorar o diagnóstico da LV (Boelaert *et al.*, 2008).

Assim, um teste sorológico ideal para o diagnóstico de LV deve basear-se no uso de antígenos reconhecidos por amostras de soros dos pacientes infectados, independentemente dos sintomas clínicos e não reconhecidos por

indivíduos não infectados pelo parasito. No entanto, o principal problema do uso de tais antígenos tem sido a sua reatividade contínua por longos períodos de tempo mesmo após o término do tratamento e a cura dos pacientes, portanto, não distinguindo os indivíduos com infecções agudas ou assintomáticas dos curados. Além disso, há problemas associados à reatividade cruzada com soros de pacientes com outras doenças infecciosas e parasitárias, como malária, doença de Chagas, entre outras, reduzindo assim a especificidade diagnóstica (Abass *et al.*, 2013). No caso de pacientes com LV co-infectados com o vírus do HIV, os testes sorológicos apresentam problemas relacionados à sua sensibilidade, uma vez que muitos pacientes têm títulos baixos de anticorpos anti-*Leishmania*, comportando-se como falsos negativos na triagem sorológica. Estima-se que cerca de 40% dos pacientes co-infectados estão nesta situação e, quando o teste de antígeno rK39 é utilizado, há relatos de valores de sensibilidade variando de 20 a 22% (Deniau *et al.*, 2003)

2.4 PHAGE DISPLAY

Phage display é uma tecnologia baseada na expressão de peptídeos, proteínas ou fragmentos de anticorpos associados a proteínas presentes na superfície externa do bacteriófago recombinante. A sequência de nucleotídeos que codifica os peptídeos é geneticamente fundida a uma sequência que codifica algumas proteínas de bacteriófagos, dando origem a um produto híbrido, que é então exposto na superfície externa das partículas virais. As bibliotecas de bacteriófagos que expressam peptídeos exógenos têm sido utilizadas na identificação de vários receptores celulares, facilitando a identificação de moléculas pequenas que se ligam com alta afinidade e imitam a interação com seus ligantes naturais, bem como na identificação de peptídeos que interagem com anticorpos sem conhecimento prévio da região antigênica reconhecida pelo anticorpo (Smith, 1985).

A seleção de moléculas de alta afinidade em relação a um determinado receptor alvo aderido a uma superfície sólida é realizada por etapas de seleção consecutivas chamadas ciclos de bio-panning. O número de ciclos de bio-panning realizados na exibição de fagos determina o grau de enriquecimento dos fagos que se ligam a um receptor alvo. Uma população de

clones de fago com alta afinidade para um determinado receptor pode ser obtida através da realização de 3 a 5 ciclos de bio-panning (Crameri & Suter, 1993).

A possibilidade de triagem de sequências distintas e específicas de peptídeos frente a uma infinidade de antígenos é a grande vantagem da técnica de *Phage display*, pois possibilita a identificação de uma sequência com alta afinidade entre milhares de outras (Ebrahimzadeh & Rajabibazl. 2014, Loset, *et al.*, 2011). Isso permite a utilização das bibliotecas de fagos frente as mais variadas proteínas e com diversos propósitos, como a vacinação (Kumar & Engwerda, 2014), o tratamento de infecções bacterianas (Filippov, *et al.*, 2012; Drulis-Kawa, *et al.*, 2012), o diagnóstico da LT (Costa, *et al.*, 2017) e a identificação de alvos para o diagnóstico e tratamento do câncer (Le Joncour & Laakkonen, 2017).

O Subcomitê de Vírus Procariotos, entidade ligada ao Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), estabeleceu a sistematização da taxonomia de fagos por meio de análises morfológicas (aspecto do capsídeo e envoltório lipídico ou lipoproteico) e genômicas (tipo de material genético, fita dupla ou simples). Dentre a grande diversidade de fagos conhecida, o fago utilizado nesse trabalho foi o *Escherichia vírus M13* (M13) pertencente à Ordem Unassigned, Família Inoviridae, gênero *Inovirus* caracterizado como fago filamentosos (Salomond & Fineran, 2015).

Esses fagos possuem um DNA circular pequeno e são secretados sem que haja lise da sua bactéria hospedeira (*Escherichia coli*). A partir de uma biblioteca de sequências de ácidos nucleicos, pequenos conjuntos randômicos destes nucleotídeos são ligados ao DNA dos M13 na região que codifica proteínas do capsídeo viral. Uma vez com esse material exógeno dentro do seu DNA um fago irá originar milhões de clones com a mesma sequência sempre que realizar seu ciclo de reprodução em *E. coli* (Salomond & Fineran, 2015; Rakonjac, *et al.*, 2011).

A interação entre fago e bactéria é específica e está relacionada com o reconhecimento pelos receptores de superfície do hospedeiro das proteínas do capsídeo viral. Uma vez estabilizada essa ligação ocorre, a passagem do genoma do fago para o interior do procarioto e sua inserção dentro do DNA hospedeiro. Esse enxerto viral é chamado de protofago, será duplicado e

transferido para as próximas gerações da bactéria, sempre que essa se reproduzir, e transcrito pelo próprio metabolismo do procarionte formando assim, proteínas virais e produzindo novos fagos geneticamente idênticos. Esses fagos filamentosos formados pela *E. coli* infectada serão secretados para o meio extracelular, sem que para isso a bactéria sofra lise. O nome dado para esse processo reprodução é de ciclo lisogênico (Rakonjac, *et al.*, 2011). Portanto, a infecção de uma bactéria por um fago é uma ferramenta poderosa dentro da biotecnologia podendo ser aplicada no tratamento de infecções bacterianas, uma vez que os fagos são hospedeiro-específico e por meio da possibilidade de produzir uma enzima a partir do enxerto viral capaz de desestabilizar a bactéria ou biofilmes ou de conferir susceptibilidade a uma população a um fármaco (Rakonjac, *et al.*, 2011; Lu & Collins, 2009).

A técnica de *Phage display* consiste no uso desses clones de fagos com peptídeos expressos sobre o capsídeo para a prospecção de proteínas alvos. Uma vez estabelecida a ligação do clone com seu alvo, o fago pode ser isolado e replicado (seleção positiva), enquanto os clones não reconhecidos são retirados por lavagem (seleção negativa). O *Phage display* apresenta diversas aplicações, pois permite a identificação de um peptídeo específico ao alvo de interesse, criando assim moléculas que podem ser usadas na confecção de nanopartículas de entrega de drogas direcionando-as para a célula alvo, no desenvolvimento de testes diagnósticos (Rakonjac, *et al.*, 2011). Outro uso promissor dessa tecnologia foi descrito em 2016, por Rhaïem e Houïmel, e consistiu na identificação de peptídeos a partir de uma biblioteca de fagos capazes de se ligar a proteína gp63 de *L. major*, diminuindo a carga parasitária em camundongos infectados e tratados com esses peptídeos.

Com a técnica de prospecção de peptídeos específicos apresentados por fagos e selecionados negativa e positivamente com IgG acoplados em microesferas magnéticas já foram identificadas sequências capazes de identificar com 100% de acurácia soros de cães infectados com *L. infantum* dos soros de cães saudáveis, vacinados ou infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (Costa, *et al.*, 2013) e de promover uma resposta imune protetora em modelos murinos desafiados com *L. infantum* e *L. amazonensis* (Costa, *et al.*, 2015; Coelho, *et al.*, 2015; Costa, *et al.*, 2014;). Essa técnica também já foi empregada para a detecção de anticorpos de soros de pacientes com LT,

sendo encontrados seis clones distintos capazes de diferenciar esses de soros de pacientes com LV, doença de Chagas, residentes de área endêmica e não endêmica, sendo que quatro desses clones conseguiam agrupar os soros de LT de acordo com a forma clínica em cutânea, que apresentaram menor absorvência e em mucosa com maior (Costa *et al.*, 2016).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo a identificação de novos mimotopos de proteínas de *L. infantum* para o sorodiagnóstico da LV por meio da técnica do *Phage display*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e validar novos alvos para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral humana utilizando a tecnologia de *Phage display*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

I. Selecionar os clones de bacteriófagos com peptídeos de superfície reativos com IgG de soros de pacientes com leishmaniose visceral, por meio de seleção negativa e positiva.

II. Identificar as sequências de aminoácidos expressas nos clones selecionados.

III. Selecionar os melhores clones capazes de identificar as amostras de soros de pacientes com LV e diferenciar estes de soros de pacientes com Doença de Chagas e indivíduos não infectados de regiões distintas.

IV. Identificar as proteínas nativas da *Leishmania* spp. que expressam os mesmos peptídeos dos clones previamente selecionados.

V. Avaliar os valores de sensibilidade e especificidade dos fagos frente a diferentes soros de pacientes com LT e DC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo envolveu a participação de pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Universidade Federal de Uberlândia (UFU), através de uma parceria científica, visando à padronização de técnicas moleculares, exibição de fagos, com vistas à melhoria da LV sorodiagnóstico. A delimitação experimental compreende as etapas mostradas na Fig. 2, começando com a definição da estratégia utilizada nos ciclos de bio-panning das análises sorológicas por fago-ELISA, a seleção e identificação dos peptídeos expressos nas capsídeos dos clones de bacteriófagos selecionados foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU e a validação dos clones para o sorodiagnóstico para LV usando as amostras individuais de soro para cada grupo foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada no Estudo de Leishmaniose, no Setor de Patologia Clínica da COLTEC e no Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

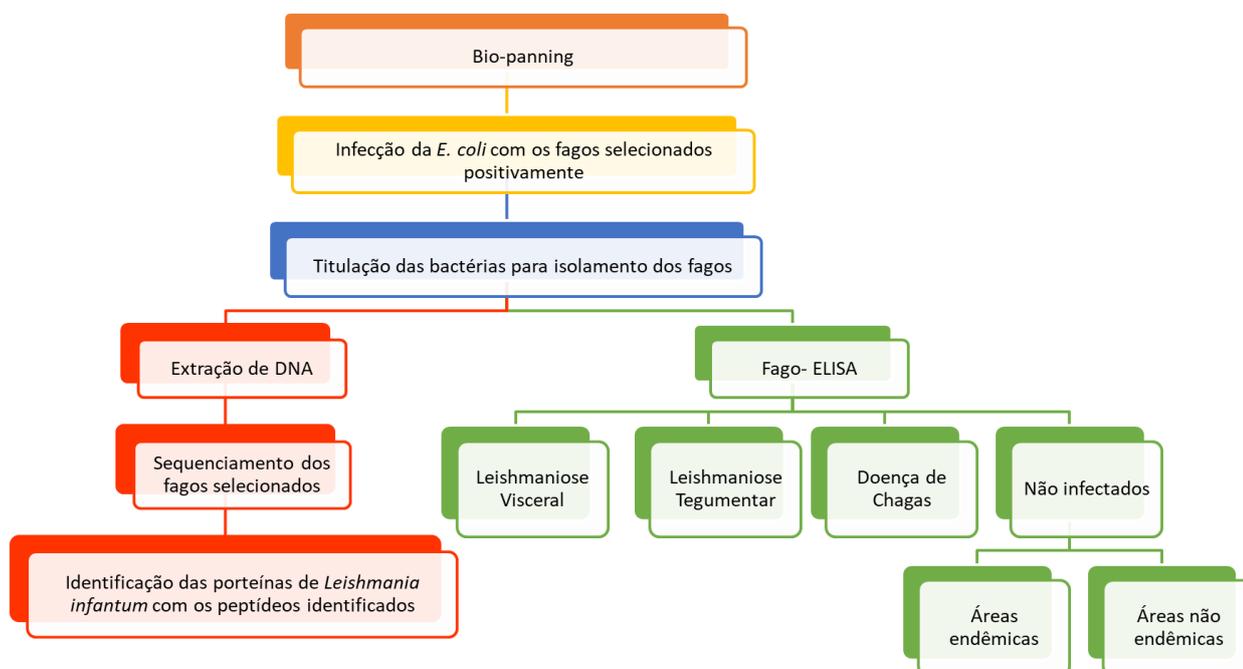


Figura 2. Fluxograma mostrando as principais etapas do trabalho.

4.2 ASPECTOS ETICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG, protocolo CAAE-32343114.9.0000.5149), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsinque. Foi obtido um consentimento informado e esclarecido de todos os pacientes, que receberam uma cópia individual da política do estudo, que foi revisada por uma pessoa independente.

4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO SOLÚVEL DE LEISHMANIA INFANTUM

Foi utilizada a linhagem *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46). As formas promastigotas de fase estacionária dos parasitos foram cultivadas a 24°C no meio completo de *Schneider* (Sigma, St. Louis, MO, EUA), que foi composto pelo meio de *Schneider* suplementado com 20% de soro de bovino fetal inativado (FBS, Sigma), 20 mM de L-glutamina, 200 U / mL de penicilina e 100 µg / mL de estreptomicina, a pH 7,4. O extrato antigénico solúvel de *L. infantum* (SLA) foi preparado conforme descrito (Coelho *et al*, 2003) e a concentração de proteínas foi estimado pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4.4 AMOSTRAS DE SORO

Foram utilizadas amostras de soros de pacientes com LV sintomática (n=30, incluindo 17 homens e 13 mulheres, com idades variando de 22 a 58 anos). A infecção foi confirmada por técnica de PCR visando o kDNA de *L. infantum* em aspirados do baço e/ou medula óssea dos pacientes. Nenhum deles foi previamente tratado com drogas antileishmanial antes da coleta das amostras. Todos os pacientes foram selecionados de uma área endêmica de doença (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). O grupo de controle consistiu em indivíduos saudáveis, que viviam em área endêmica (Belo Horizonte, n=27, incluindo 15 do sexo masculino e 12 do sexo feminino, com idades entre 17 a 42 anos) ou não endêmicas para LV (Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil; n=30, incluindo 18 homens e 12 mulheres, com idades variando de 19 a 48

anos), e nenhum deles apresentou sinais clínicos ou suspeitos de leishmaniose. As amostras de soro de pacientes com doença de Chagas (n=15, incluindo 9 do sexo masculino e 6 do sexo feminino, com idades variando de 27 a 55 anos) foram utilizadas nos ciclos de bio-panning, com o objetivo de excluir os clones de fagos de reação cruzada. A infecção foi confirmada por hemocultura e pelo teste de ELISA v. 3.0 de *Chagatest* recombinante ou teste de inibição de hemoaglutinação de *Chagatest* (HAI) (Wiener Lab, Argentina). Amostras de soro de pacientes com LT desenvolvendo a forma mucosa (ML; n=34, incluindo 23 homens e 11 mulheres, com idades entre 22 e 62 anos) ou cutânea (CL; n=10, incluindo 6 do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com idades variando de 18 a 47 anos), também foram empregadas nos ensaios de fago-ELISA. O diagnóstico foi confirmado quando os parasitos foram visualizados em esfregaços corados com *Giemsa* obtidos a partir de fragmentos mucosos ou biópsias cutâneas, respectivamente. A positividade das amostras foi também confirmada pela presença de kDNA de *L. braziliensis* através da técnica de PCR e por uma reação de SLA *L. braziliensis*-ELISA (dados não mostrados).

4.5 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS IgGs

A purificação de anticorpos IgGs foi realizada acoplando-os em microesferas magnéticas conjugadas com a proteína G (*Dynabeads*, Invitrogen), conforme descrito (Costa *et al*, 2014). Resumidamente, 2×10^{10} partículas das microesferas foram lavadas três vezes em 1 mL de ácido [2- (N-morfolino) etanosulfônico de tampão MES 0,1 M] pH 5,0 e 350 μ L de grupo de soro de indivíduos saudáveis ou de pacientes que desenvolveram doença de Chagas ou LV (n=5, por grupo) foram adicionadas às microesferas e submetidas a uma incubação de 40 min, à temperatura ambiente e sob agitação constante. As microesferas acopladas a IgG foram lavadas quatro vezes em 1 mL de tampão MES 0,1 M, com o objetivo de remover os anticorpos não aderidos. O complexo de pérolas-anticorpo foi lavado três vezes em 1 mL de tampão de trietanolamina 0,2 M pH 8,0 e ressuspenso em 1 mL de tampão de acoplamento covalente (pimelimidato de dimetilo 20 mM/HCl diluído em tampão de trietanolamina) durante 30 minutos à temperatura ambiente e sob agitação constante. A neutralização dos locais reativos não ligados foi

realizada usando 1 mL de Tris-base 50 mM pH 7,5, durante 15 min e à temperatura ambiente. As microesferas foram lavadas duas vezes em 1 mL de tampão TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20), bloqueados com uma solução de bloqueio de 2 mL (5% de BSA diluído em TBS-T) por 1 h a 37°C e ressuspensa em 200 µl de tampão TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NaCl 150 mM). Para verificar o acoplamento, incubaram-se 5 µL das nano esferas acopladas a IgG com um anticorpo anti-IgG humana de peroxidase, durante 1 h a 37°C (diluição 1: 10000) e lavou-se duas vezes com 1 mL de TBS-T e a reação foi desenvolvida usando o substrato TMB. Após 30 min, foi interrompido pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 2 N, e os valores de densidade óptica (OD) foram avaliados em um espectrofotômetro de microplacas ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá), a 450 nanômetros.

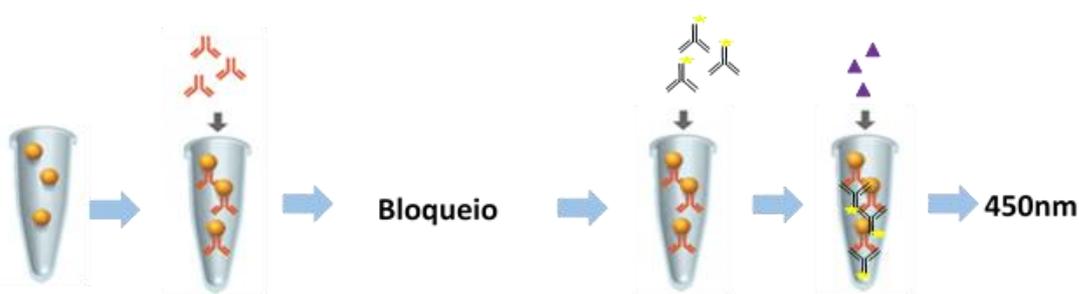


Figura 3: Metodologia de acoplamento das microesferas magnéticas com anticorpos IgGs de soros de pacientes saudáveis e com infecções distintas. As *beads* (círculos amarelos) foram divididas igualmente em três grupos e cada um foi colocado com IgG (laranja) de soros de pacientes saudáveis (I), com Doença de Chagas (II) e com Leishmaniose visceral (III). O anti-IgG humano acoplado com peroxidase (em verde e amarelo, respectivamente) foi utilizado para confirmar o acoplamento juntamente com substrato TMB (roxo).

4.6 PHAGE DISPLAY

Para realizar o processo de seleção dos substratos exibidos pelos fagos, 2×10^{11} partículas virais de uma biblioteca de exibição de fago contendo peptídeos aleatoriamente fundidos à proteína de revestimento pIII de fagos filamentosos M13 (biblioteca Ph.D.-C7C, New England BioLabs, USA) foram diluídos em 190 µL de tampão TBS-T. A mistura foi incubada durante 30 min, à temperatura ambiente, com as microesferas acopladas aos anticorpos IgG de indivíduos saudáveis, que foram capturados magneticamente (suporte Dynal Biotech, 12020). O sobrenadante contendo clones foi recuperado e transferido

para um novo tubo, e o procedimento foi repetido duas vezes. Uma segunda seleção negativa foi realizada usando esferas magnéticas acopladas a IgG de pacientes com doença de Chagas e os clones não ligados foram recuperados e transferidos para um novo tubo, quando o procedimento também foi repetido duas vezes. Para a seleção positiva, os fagos recuperados ao sobrenadante foram submetidos a uma incubação usando as microesferas acopladas a IgG derivadas de pacientes com LV, que foram incubadas durante 30 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e os fagos unidos foram lavados cinco vezes em 1 mL de tampão TBS-T, depois foram eluídos em 500 µL de tampão de glicina 0,2 M, pH 2,0. Em seguida, adicionaram-se 75 µL de base de Tris 1 M pH 9,0 para neutralizar o pH ácido da solução. Posteriormente, os clones recuperados foram transferidos para um novo tubo e o procedimento foi repetido duas vezes, quando os fagos foram recuperados e titulados. Para isso, os clones obtidos na terceira rodada de seleção de bio-panning foram diluídos usando uma diluição de 10^{-1} a 10^{-12} em 500 µL de tampão de TBS, misturado com a estirpe *E. coli* ER3728 (New England BioLabs, USA), cultivada em meio líquido até atingir a densidade ótica (OD) de 600nm e plaqueados em placas de ágar LB contendo 1 mL de IPTG/X-gal (1,25 g de IPTG, 1 g de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-p-D-galactósido e 25 mL de DMSO). Em seguida, a titulação foi realizada contando o número de colônias em cada placa.

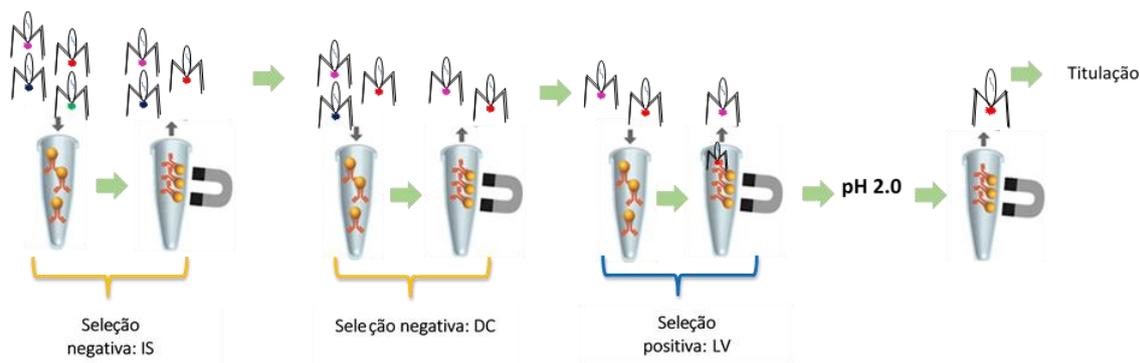


Figura 4: Representação do processo de bio-panning. A partir de uma biblioteca de fagos com peptídeos exógenos realizou-se a seleção negativa separando os fagos capazes de reconhecer soros de IS (indivíduos saudáveis) e com DC (doença de chagas), dos não capazes. Com os fagos obtidos da seleção negativa realizou-se a seleção positiva, com soro de LV (Leishmaniose Visceral), eluindo-se apenas os clones que reconhecem o IgG dos pacientes com LVH para isolamento deles.

4.7 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES SELECIONADOS

Noventa e seis colônias foram individualmente colhidas e amplificadas em 250 μ L de meio LB em uma microplaca de cultura estéril (*BD Falcon TM clear, 96-well microtest TM plate*), que foi selada e incubada durante 6 h a 37°C sob agitação constante. Após a incubação, a placa foi centrifugada durante 20 minutos em 2.500 x g e o sobrenadante foi transferido para uma nova placa, na qual foi adicionada uma solução de PEG/NaCl (20% de PEG 8000 e 2,5 M de NaCl) (1/6 do total volume). Em seguida, a placa foi incubada durante 18 h a 4°C e centrifugada durante 1 h. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuscitado em 500 μ L de tampão TES (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA e 4 M NaI). Em seguida, a placa foi vigorosamente agitada durante 5 minutos, quando foram adicionados 300 μ L de uma solução de etanol a 70%. A reação foi incubada durante 10 min e o DNA foi precipitado por centrifugação em 2.500 x g durante 10 min, a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento de cada clone foi lavado em 500 μ L de etanol a 70%, seco e diluído em 20 μ L de água ultra-pura. A pureza do DNA foi avaliada num gel de agarose a 1%, que foi corado com brometo de etídio (10 μ g/mL). A sequenciamento foi realizada por eletroforese capilar no equipamento ABI 3130, usando o BigDye v 3.1 e o polímero POP7 (Myleus Biotechnology[®], Belo Horizonte, Minas Gerais,

Brasil). Para análises de arquivos de saída AB1, o software de varredura de sequências (*Applied Biosystems*) foi empregado.

4.8 BIOINFORMÁTICA

As sequências de DNA foram analisadas por bioinformática usando servidores on-line. A biblioteca de *Phage display* restrita e utilizada para a seleção apresenta peptídeos conformacionais com cisteínas nas bordas, portanto, as análises de peptídeos foram realizadas com a sequência peptídica de 7-meros e as sequências de aminoácidos (AC-xxxxxx-CGGGS) contidas na fusão com a proteína pIII do capsídeo do bacteriófago, como anteriormente descrito (Alves, *et al*,2014). As sequências de aminoácidos foram deduzidas com base nas sequências de nucleotídeos através do programa Expsy (<http://web.expasy.org/translate/>) e foram analisadas por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra proteínas e motivos da base de dados GenBank. A função de proteína putativa foi prevista pelo alinhamento de busca BLAST no servidor UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>). As propriedades físico-químicas dos peptídeos, como o peso molecular e o ponto isoelétrico, foram preditas usando a ferramenta: *Compute pI / Mw no Expsy Server* (http://web.expasy.org/compute_pi/). A hidrofobicidade e a carga líquida dos peptídeos foram preditas usando o servidor de banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/prediction/predictionmain.php>), conforme descrito (Wang, *et al*, 2009).

4.9 FAGO-ELISA

Os clones de fagos isolados a partir da terceira rodada de bio-panning positiva foram avaliados em uma técnica de fago-ELISA, e SLA *L. infantum* foi utilizado como controle. Para estes ensaios, as placas foram revestidas individualmente com 1×10^9 fagos ou SLA (1 µg por poço) e incubadas com um conjunto de soros (1:100 diluídos em tampão TBS) de cada grupo de pacientes e controle. Os soros testes usados para a purificação de IgG foram utilizados nestas análises sorológicas. Foi utilizado um anticorpo conjugado de peroxidase de IgG anti-humano (1:10.000 diluído em tampão de TBS,

catalisador de SAB3701282, Sigma-Aldrich, USA) como um anticorpo secundário e a reação foi desenvolvida após incubação durante 30 min, com H₂O₂, orto-fenilenodiamina e tampão citrato-fosfato, pH 5,0. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2N, e os valores de DO de cada amostra foram obtidos num espectrofotômetro de microplaca ELISA, a 492 nm.

4.10 ELISA PARA SORODIAGNOSTICO DA LV HUMANA

Os clones de fago selecionados no passo anterior foram testados quanto ao sorodiagnóstico da LV usando um painel sorológico. Antes, as curvas de titulação foram realizadas para determinar a concentração mais adequada dos antígenos e diluições de anticorpos a serem utilizadas. Placas de microtitulação flexíveis (Jet Biofil[®], Belo Horizonte) foram revestidas com os clones de fago selecionados (1 x 10⁹ fagos por poço). Além disso, um clone de fago M13 de tipo selvagem (WTP, 1 x 10⁹ fagos por poço) foi usado como controle negativo, enquanto que *L. infantum* SLA (1,0 µg por poço) foi usado como um controle positivo. Os antígenos foram diluídos em 100 µL de tampão de revestimento (tampão de carbonato 50 mM) pH 9,6 e incubados durante 16 h a 4°C. Depois, os locais de ligação livre foram bloqueados usando 200 µL de uma solução de bloqueio (5% albumina bovina ultrapura diluída em TBS-T), durante 2 h a 37°C. Após, as placas foram lavadas cinco vezes com TBS-T, foram adicionados 100 µL de amostras de soro humano (1:100 diluídas em TBS) e incubadas durante 1 h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com TBS-T e incubadas com anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1: 10 000 diluído em TBS, Sigma-Aldrich), durante 1 h a 37°C. Após a lavagem de placas cinco vezes com TBS-T, a reação foi desenvolvida pela incubação com H₂O₂, orto-fenilenodiamina e tampão citrato-fosfato pH 5,0, durante 30 min e no escuro. Em seguida, a reação foi interrompida adicionando 25 µL de H₂SO₄ 2N, e os valores de OD foram obtidos utilizando um espectrofotômetro de microplaca ELISA, a 492 nm.

4.11 TESTE RÁPIDO KALAZAR DETECT™

O teste Kalazar Detect™ para o sorodiagnóstico da LV é um método imunocromatográfico usado para detectar a presença de anticorpos específicos

para rK39 em amostras de soro humano. O protocolo técnico foi desenvolvido de acordo com as instruções do fabricante (InBios International, USA).

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows e Microsoft Excel (versão 10.0)). Os valores de corte para cada antígeno foram determinados usando análise de característica operacional do receptor (ROC) e a sensibilidade máxima foi calculada estabelecendo uma especificidade de 100% para todos os antígenos. Em primeiro lugar, as curvas ROC foram traçadas com os valores de amostras de soro de pacientes com LV sintomática versus os controles saudáveis de uma área endêmica de leishmaniose. Em segundo lugar, as curvas ROC foram traçadas com valores de pacientes com doença de Chagas versus aqueles de pacientes com LV, bem como com valores de controles saudáveis que vivem em uma área não endêmica de pacientes com LV versus LV e valores de TL versus LV. Os valores de corte para cada clone de fago foram os obtidos por meio dessa análise. As tabelas de contingência e o teste exato de Fisher ($P < 0,05$) foram utilizados para comparar o desempenho diagnóstico dos antígenos. Isso foi estimado pela avaliação de sensibilidade, especificidade, intervalo de confiança de 95% (IC 95%), relação de similaridade positiva (LR +) e relação de similaridade negativa (LR-). A precisão foi avaliada de acordo com a área sob a curva (AUC) em relação à curva ROC (IC 95%). O acordo além do acaso foi avaliado usando o coeficiente kappa (k) (IC 95%) e interpretado de acordo com a seguinte escala: 0,00 a 0,20 (insignificante), 0,21 a 0,40 (fraco), 0,41 a 0,60 (moderado), 0,61 a 0,80 (bom) e 0,81 a 1,00 (excelente).

5 RESULTADOS**5.1 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS ESPECÍFICOS**

Inicialmente, uma seleção de peptídeos expressos nos fagos foi realizada. Para isso, desenvolveu-se uma seleção negativa e consistiu na exclusão dos fagos apresentando reatividade cruzada com anticorpos isolados de soro de indivíduos saudáveis ou pacientes com doença de Chagas. Depois, realizou-se uma seleção positiva consistindo em manter os clones específicos para interagir com anticorpos em soro de pacientes com LV. Após três rodadas de seleção positiva, 96 clones de fago foram isolados e avaliados por uma técnica de fago-ELISA. Somente foram selecionados e analisados individualmente aqueles que foram altamente reativos com soros de pacientes com LV (soros positivos), mas apresentaram baixa ou falta de reatividade com soros de controle (soros negativos).

Os resultados foram comparáveis aos obtidos utilizando SLA de *L. infantum* como antígeno. Os valores individuais de DO para cada clone foram utilizados para calcular a proporção entre as amostras de soro positivo e negativo, e foram selecionados valores de OD superiores aos obtidos para SLA (1,9). Como consequência, 42 clones de fagos foram selecionados e seu DNA foi extraído e sequenciado, visando identificar os peptídeos exógenos específicos. Os resultados permitiram a caracterização de oito peptídeos: A3 (FLCSHSN), A5 (TFLFFPA), A8 (TFLVPLQ), A11 (RYVSVAS), B2 (FLSDVGE), B9 (TFFLRVR), H11 (INRSIKG) e G12 (LIKISTK). As análises de alinhamento foram realizadas utilizando as sequências peptídicas e os motivos de consenso foram determinados entre as sequências selecionadas (Tabela 1). Além disso, a carga líquida, hidrofobicidade e peso molecular estimado dos oito peptídeos selecionados também são mostrados.

Tabela 1: Caracterização dos peptídeos selecionados derivados dos antígenos de *Leishmania infantum* selecionados pela tecnologia de exibição de fagos. Abreviaturas: PM: peso molecular.

Clone	Sequência peptídica	Carga líquida	Hidrofobicidade	PM
A3	AC-FLCSHSN-CGGGS	0	42%	1342.501
A5	AC-TFLFFPA-CGGGS	0	57%	1371.61
A8	AC-TFLVPLQ-CGGGS	0	53%	1259.523
A11	AC-RYVSVAS-CGGGS	+1	42%	1316.483
B2	AC-FLSDVGE-CGGGS	-2	42%	1301.423
B9	AC-TFFLRVR-CGGGS	+2	50%	1473.746
G12	AC-INRSIKG-CGGGS	+2	35%	1322.53
H11	AC-LIKISTK-CGGGS	+2	42%	1337.621

Foi realizada uma análise de alinhamento e um motivo de consenso foi determinado entre sequências peptídicas selecionadas (Tabela 2). Uma análise de BLAST para os péptidos selecionados e o motivo de consenso combinados com proteínas parasitárias putativas, como uma proteína hipotética (XP_001469726. 1), transportador de ABC-thiol (XP_001465706.1) e cisteína peptidase de calpaína (XP_001468417.1); e a maioria deles está estruturalmente relacionada com proteínas de membrana do parasito (Tabela 3). A análise de péptidos individuais e a maior homologia para proteínas de alvos também é apresentada (Tabela 4). Em seguida, os clones de fago selecionados que expressam os péptidos antigênicos foram avaliados individualmente em novas análises sorológicas para o serodiagnóstico da LV humana.

Tabela 2: Alinhamento de seqüência de péptidos selecionados por tecnologia de exibição de fagos empregada para o serodiagnóstico da leishmaniose visceral.

Clone	Sequencias peptídicas
A5	ACT F LF F -- PA —CGGGS
A8	ACT F L--- VPLQ -CGGGS
B9	ACT F L R — VR ---CGGGS
B2	AC- F L- S D V GE—CGGGS
A3	AC- F L C S H — SN -CGGGS
A11	ACRY V R S - V - S —CGGGS
G12	ACIN- R S I -KG—CGGGS
H11	AC-- L I K I— S T K CGGGS
Motivo consenso	ACTFLRSIVPS —CGGGS

Tabela 3: Alinhamento local básico (BLASTp-NCBI) para o epitopo de consenso com o banco de dados de proteínas de espécies de *Leishmania infantum*. a) Nome da proteína identificada. B) Porcentagem da seqüência peptídica em relação à proteína identificada. c) A probabilidade do alinhamento de aminoácidos ocorreu aleatoriamente. d) Percentual encontrado de similaridade entre as seqüências peptídicas e as proteínas no banco de dados. e) Números de acesso de acordo com NCBI. f) Função conhecida da proteína identificada.

Proteína ^a	Query cover (%) ^b	E-value ^c	Identity (%) ^d	Número de acesso ^e	Função ^f
Hypothetical protein	68	6.7	100	XP_00146450 7.2	Unknown
ATP-binding cassette protein subfamily C, member 2	75	14	67	XP_00146570 1.1	ATPase activity
Putative coatomer beta subunit	37	20	83	XP_00146526 8.1	Structural
Katanin-like protein	50	28	100	XP_00146438 9.1	ATP binding
ABC-thiol transporter	75	14	67	XP_00146570 6.1	Transmembrane protein: ATP binding
Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M1	31	57	100	XP_00146675 2.1	Metallopeptidase, zinc ion binding
Calpain-like cysteine peptidase	43	82	100	XP_00146841 7.1	Calcium-dependent cysteine-type endopeptidase ¹

Tabela 4: Alinhamento local básico (BLASTp-NCBI) para cada epítipo dos clones selecionados com o banco de dados de proteínas de espécies de *Leishmania infantum*. a) Nome da proteína identificada. b) Porcentagem da sequência peptídica em relação à proteína identificada. c) A probabilidade do alinhamento de aminoácidos ocorreu aleatoriamente. d) Percentual encontrado de similaridade entre as sequências peptídicas e as proteínas no banco de dados. e) Números de acesso de acordo com NCBI. f) Função conhecida da proteína identificada.

Clone ^a	Protein ^b	Query cover (%) ^c	E-value ^d	Identity (%) ^e	Accession Number ^f	Function ^g
A3	Hypothetical protein	78	3.4	86	XP_001469726.1	Unknown
	Cystathionine beta-lyase-like protein	64	1.7	64	XP_001464230.2	Cystathionine beta-lyase activity; pyridoxal phosphate binding
A5	Katanin-like protein	35	20	100	XP_001464389.1	ATP binding
	Putative Tob55	35	6.8	100	XP_001466709.1	Unknown
A8	AUT2/APG4/ATG4 cysteine peptidase	78	2.4	63	XP_001463494.1	Cysteine-type peptidase activity
	Katanin-like protein	35	20	100	XP_001464389.1	ATP binding
A11	ATP-binding cassette protein subfamily A, member 10	85	3.4	100	XP_001466583.1	ATPase activity; ATP binding; transporter activity
	Transport protein Sec31, partial	57	9.7	100	XP_001463913.2	Unknown
B2	Cytochrome c oxidase protein	42	4.8	100	XP_003392181.1	Copper ion binding; cytochrome-c oxidase activity
	Phosphatase-like protein	57	4.9	86	XP_001463035.1	Protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity
B9	Inositol polyphosphate kinase-like protein	57	4.8	88	XP_001464217.1	Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity
	ATP-binding cassette protein subfamily A, member 10	57	59	67	XP_001466583.1	ATPase activity; ATP binding; transporter activity
G12	Hypothetical protein	78	4.8	88	XP_001465427.1	Unknown
	Endonuclease/exonuclease/phosphatase-like protein	42	14	100	XP_001470130.1	Endonuclease activity; exonuclease activity
H10	Hypothetical protein	42	59	83	XP_001467266.1	Zinc ion binding
	Katanin	50	122	71	XP_001470082.1	Microtubule-severing ATPase activity

5.2 DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DOS CLONES SELECIONADOS

O desempenho diagnóstico dos clones de fago selecionados foi investigado avaliando sua reatividade sorológica por meio de uma técnica de fago-ELISA, utilizando amostras de soro humano de um painel sorológico. Nos resultados, os oito clones especificamente discriminaram pacientes com LV de indivíduos saudáveis, sem apresentar nenhum resultado falso positivo (Tabela 5). Destaca-se que uma amostra de soro entre indivíduos saudáveis apresentou um valor de OD semelhante (0,663) ao valor de corte calculado (0,665). Por essa razão, foi considerado negativo. Além disso, os oito clones apresentaram curvas ROC altamente precisas ($AUC = 1,0$), índice kappa (1.000) e valores estatisticamente significativos ($P < 0.0001$), quando analisados pelo teste exato de Fisher. As curvas ROC foram construídas fixando a especificidade em 100%, e os valores de sensibilidade para todos os clones atingiram 100%, ao passo que o clone WTP e SLA *L. infantum* mostraram valores de sensibilidade de 22% e 55%, respectivamente.

Tabela 5: Avaliação diagnóstica de clones de fago selecionados para diferenciar entre pacientes com leishmaniose visceral dos indivíduos saudáveis. O teste de fago-ELISA foi realizado utilizando amostras de soro de pacientes com leishmaniose visceral (n=30) e soros de indivíduos saudáveis que vivem em uma área endêmica de leishmaniose (n=27). A significância estatística de acordo com o teste exato de Fisher. Abreviações: ADC: área debaixo da curva; N: número total de soros avaliados; CI95%: intervalo de confiança; VP: verdadeiro positivo (pessoas doentes identificadas corretamente como doentes); VN: verdadeiro-negativo (pessoas saudáveis identificadas corretamente como saudáveis); FP: falso positivo (pessoas saudáveis identificadas incorretamente como doentes); FN: falso negativo (pessoas doentes erroneamente identificadas como saudáveis); WTP: fago de tipo selvagem; NS: sem significância.

Clone	ADC	CI 95%	VP	VN	FP	FN	N°	P-value ^a	Kappa	CI 95%	LR+	LR-
A3	1.000	1.000-1.000	30	27	0	0	57	P<0.0001	1.000	1.000-1.000	0	0
A5	1.000	1.000-1.000	30	27	0	0	57	P<0.0001	1.000	1.000-1.000	0	0
A8	1.000	1.000-1.000	30	27	0	0	57	P<0.0001	1.000	1.000-1.000	0	0
A11	1.000	1.000-1.000	30	27	0	0	57	P<0.0001	1.000	1.000-1.000	0	0
B2	1.000	1.000-1.000	30	27	0	0	57	P<0.0001	1.000	1.000-1.000	0	0
B9	1.000	1.000-1.000	30	27	0	0	57	P<0.0001	1.000	1.000-1.000	0	0
H11	1.000	1.000-1.000	30	27	0	0	57	P<0.0001	1.000	1.000-1.000	0	0
G12	1.000	1.000-1.000	30	27	0	0	57	P<0.0001	1.000	1.000-1.000	0	0
WTP	0.576	0.424-0.728	6	27	0	24	57	NS	0.231	0.064-0.398	- 0.020	0
SLA	0.960	91.33-1.000	18	27	0	12	57	P<0.0001	0.587	39.8-77.60	3.226	0

Os oito clones de fagos mostraram um excelente desempenho para diferenciar sorologicamente os pacientes com LV da doença de Chagas ou pacientes com TL, bem como de indivíduos saudáveis que vivem em uma área não endêmica de LV, apresentando 100% de sensibilidade. Pelo contrário, o clone WTP mostrou valores de sensibilidade de 40%, 13,3% e 60%, respectivamente, enquanto que SLA *L. infantum* apresentou valores de sensibilidade de 56%, 52% e 100%, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6: Desempenho diagnóstico de clones de fago selecionados usando diferentes amostras de soro humano. Amostras de DC (n = 15), ML (n = 34), CL (n = 10) ou LV (n = 30), bem como soros de IS que vivem em um não endêmico (n = 30) área de leishmaniose foi utilizada em um fago-ELISA. As curvas ROC foram utilizadas para determinar a sensibilidade ELISA (Se), especificidade (Sp) e Área debaixo da curva (ADC). Abreviaturas e símbolos: ML: leishmaniose mucosa; CL: leishmaniose cutânea; LV: leishmaniose visceral; x: versus.

Clone	DC X LV			IS X LV			TL X LV		
	Se (%)	Sp (%)	ADC	Se (%)	Sp (%)	ADC	Se (%)	Sp (%)	ADC
A3	100	100	1.0	100	100	1.0	100	100	1.0
A5	100	100	1.0	100	100	1.0	100	100	1.0
A8	100	100	1.0	100	100	1.0	100	100	1.0
A11	100	100	1.0	100	100	1.0	100	100	1.0
B2	100	100	1.0	100	100	1.0	100	100	1.0
B9	100	100	1.0	100	100	1.0	100	100	1.0
H11	100	100	1.0	100	100	1.0	100	100	1.0
G12	100	100	1.0	100	100	1.0	100	100	1.0
WTP	40.00	100	0.644	60	100	0.898	13.33	100	0.617
SLA	56.00	100	0.875	100	100	1.0	52.00	100	0.924

Além disso, os valores individuais de OD para cada amostra de soro em relação aos oito clones de fago são mostrados (Fig. 5). A sensibilidade desses clones foi comparada com os resultados obtidos utilizando o kit disponível comercialmente para o sorodiagnóstico LV humano (Kalazar Detect™ Rapid Test). Quando este teste foi empregado, a positividade em 24 de 30 amostras de soro de pacientes com LV foi encontrada (com 20% de resultados falso-negativos). Por outro lado, todas as amostras de soro de indivíduos saudáveis que vivem em uma área não endêmica de LV (n=30) mostraram resultados negativos para o teste imunocromatográfico. No entanto, sete de 27 soros dos indivíduos saudáveis que vivem em uma área endêmica da doença apresentaram resultados positivos (representando 25% dos resultados falso-positivos). Como consequência, o desempenho moderado deste teste comercial, com diagnóstico errado significativo de LV e amostras de controles saudáveis, demonstra a necessidade urgente de melhorar os testes de diagnósticos atualmente disponíveis.

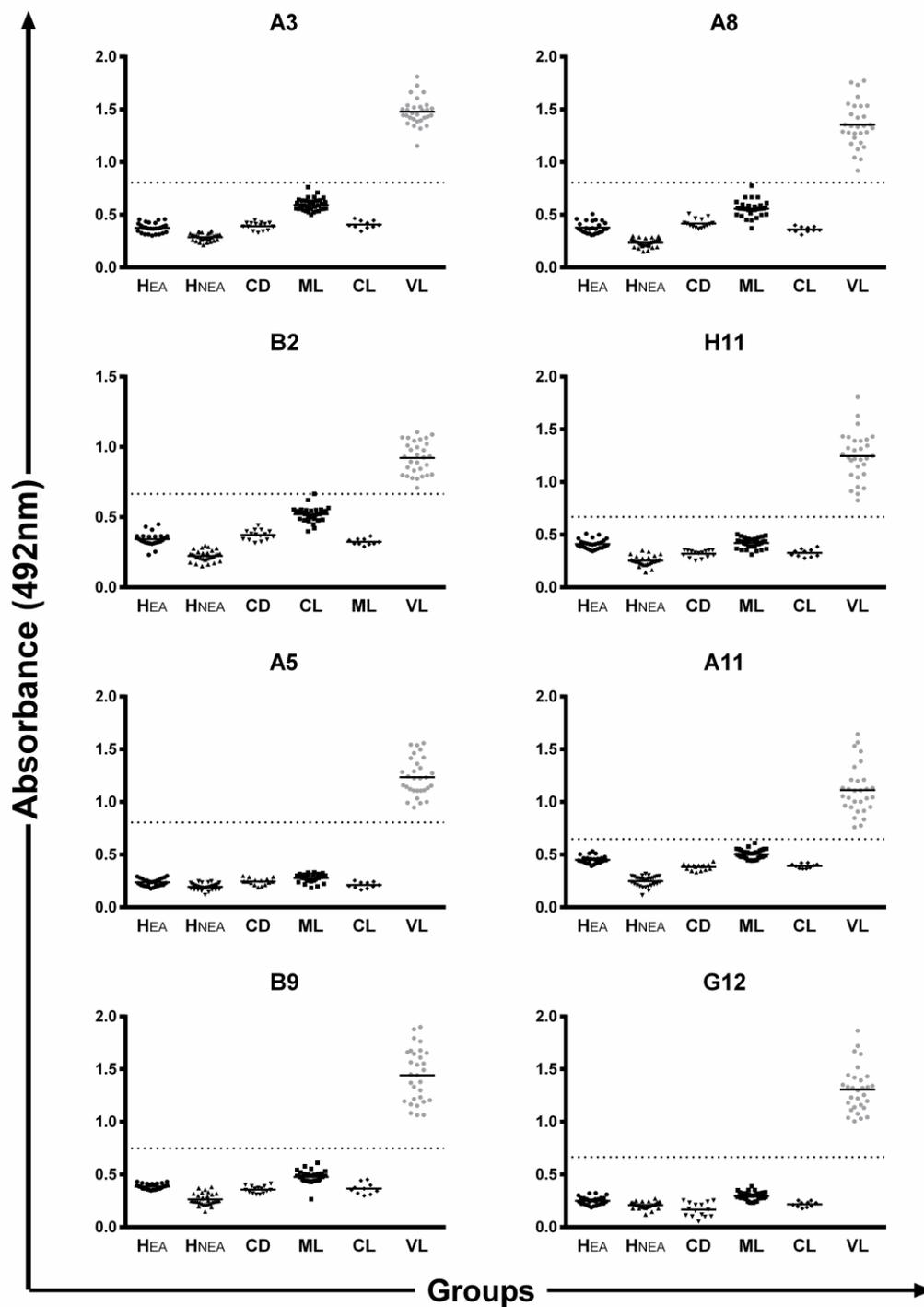


Figura 5: Reatividade dos clones de fago por um fago-ELISA contra amostras de soro humano. A densidade óptica individual de cada amostra de soro em relação aos clones individuais é mostrada. Doentes da doença de Chagas (CD, n = 15), CL (n = 10), ML (n = 34) ou LV (n = 30); Além dos soros derivados de indivíduos saudáveis que vivem em uma área endêmica (n = 27) ou não endêmica (n = 30) da leishmaniose foram utilizados. Os valores de corte (linhas pontilhadas) foram calculados usando curvas ROC. Abreviações: HEA: sujeitos saudáveis que vivem em uma área endêmica; HNEA: indivíduos saudáveis que vivem em uma área não endêmica; CD: doença de Chagas; ML: leishmaniose mucosa; CL: leishmaniose cutânea; LV: leishmaniose visceral.

6 DISCUSSÃO

Os métodos imunológicos foram empregados como uma estratégia importante para o diagnóstico de LV, devido às suas vantagens em comparação com métodos parasitológicos, apresentando uma sensibilidade e especificidade melhoradas e sendo considerados menos invasivos do que os aspirados necessários para os exames parasitológicos (Mohebbali, *et al*, 2010).

Neste contexto, no presente estudo, por meio da tecnologia de exibição de peptídeos na superfície de bacteriófagos, uma estratégia de seleção rigorosa para a identificação de novos alvos específicos foi utilizada para o sorodiagnóstico da LV. Esta tecnologia tem sido empregada para identificar novos candidatos biológicos a serem aplicados em outras doenças parasitárias, como a lepra (Alban, *et al*, 2014), *Strongyloidiasis* (Alves, *et al*, 2014) e anaplasmose bovina (Suo, *et al*, 2015).

A identificação de oito sequências peptídicas e a inédita aplicação delas para a diferenciação de soros de LV dos negativos foi depositada como patente (Anexo 2). Esse fato se deve ao encontro de 100% de sensibilidade e especificidade nos testes aqui realizados. A sensibilidade de um teste está relacionada com a capacidade do mesmo de encontrar o positivo dentre o negativo, no caso dos antígenos selecionados neste trabalho, estes foram capazes de diferenciar os soros de LV ativa dos de pessoas não infectadas residentes em áreas endêmicas e não. Essa característica pode ser relacionada à eficiência da técnica de *Phage display* de selecionar negativamente antígenos por meio da retirada dos fagos reconhecidos pelo anticorpo presente em pool de soros de pessoas saudáveis. A especificidade está relacionada com a diferenciação dos soros dos pacientes com LV daqueles com infecções de organismos próximos filogeneticamente da *L. infantum* e está relacionada não apenas com a seleção negativa dos fagos reconhecidos por soros de infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, como também a realização do bio-panning positivo com soros de LV em 3 ciclos consecutivos para aumentar a especificidade da ligação entre fagos e anticorpo. Portanto, os resultados demonstram a eficiência da técnica do *Phage display* no sentido

de revelar um peptídeo altamente específico dentre milhares de outros (Rhaïem & Houïmel, 2016; Salmond & Fineran, 2015).

A estratégia deste trabalho resultou na identificação de antígenos à base de epitopos, chamados mimotopos, que foram bem avaliados para o sorodiagnóstico da LV humana. Estes clones de fagos foram capazes de distinguir os pacientes com LV dos indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas ou não endêmicas de LV, bem como de pacientes com doença de Chagas. Esta acurácia é muito importante, uma vez que a reatividade cruzada foi relatada quando outras moléculas são usadas para identificar pacientes com LV, apresentando problemas com sua especificidade, bem como de sensibilidade quando os pacientes após os tratamentos são avaliados (Chappuis *et al*, 2007; Sundar & Rai, 2002). Embora nossos mimotopos não tenham sido investigados nessa situação, é certamente uma perspectiva futura a ser desenvolvida.

Para LV canina, Costa *et al.* (2014) usaram uma seleção sequencial de peptídeos exibidos em fagos e antígenos identificados que atingiram valores de sensibilidade e especificidade de 100%, sem mostrar resultados falso-positivos para cães infectados com *T. cruzi* ou *Ehrlichia canis*, bem como para animais saudáveis mas imunizados com vacinas comerciais Leishmune® ou Leish-Tec®. Para LT, Costa, *et al.* (2016), utilizando a mesma técnica aqui descrita, demonstrou 6 sequências altamente específicas, capazes de diferenciar soros de pacientes com LT dos com LV e doença de Chagas. Esses estudos corroboraram com os resultados aqui apresentados, onde se identificou novos mimotopos para o sorodiagnóstico da LV que não apresentava reatividade cruzada com anticorpos de pacientes com doença de Chagas ou com aqueles obtidos de indivíduos saudáveis. Os oito clones selecionados foram capazes de discriminar sorodiagnóstico os pacientes infectados com *L. infantum*, com 100% de sensibilidade e valores de especificidade, através de uma técnica de fago-ELISA. Outra técnica descrita para o diagnóstico da LV é o uso do kit *Kala-zar latex agglutination test* (KAtex) para a avaliação de anticorpos na urina dos pacientes com LV caracterizando uma forma não invasiva de coleta de amostra do paciente. O KAtex apresentou especificidade de 100%, porém a sensibilidade foi de 75%, pois das 36 amostras totais positiva para LV, 9 delas foram apresentadas como negativas pelo teste (Salam, *et al.*, 2011). Esse

resultado demonstra que a dosagem de anticorpos utilizando a urina dos pacientes pode ser um método promissor para diagnóstico da LV e a avaliação da capacidade dos fagos aqui descritos em reconhece anticorpos a urina se mostra como uma possibilidade factível, podendo aprimorar a sensibilidade de um exame não invasivo.

Os testes sorológicos para a LV atualmente utilizados, como o rK39 (com sensibilidade de 93,9% e especificidade de 95,3%), apresentam limitações importantes, como a não identificação de recidivas, a não diferenciação de pessoas infectadas assintomáticas das com sintomas, baixa reatividade em pacientes co-infectados pelo HIV (Chappuis, *et al.*, 2007; Chappuis, *et al.*, 2006). Portanto, a superação delas impactará diretamente na taxa de mortalidade uma vez que o diagnóstico preciso e rápido garante o início do tratamento correto em tempo hábil. Conforme descrito anteriormente (Sivakumar, *et al.*, 2006; Takagi, *et al.*, 2007), foram avaliados os antígenos recombinantes para o sorodiagnóstico da LV humana, e a maioria deles é detectada por soro de pacientes infectados e desenvolvendo a doença ativa. A proteína rK39 foi considerada um dos marcadores de diagnóstico mais eficazes para LV, com sensibilidade próxima a 98% (Mohapatra, *et al.*, 2010).

No Brasil, os valores de sensibilidade e especificidade variaram entre 82 e 100% (Badaro, *et al.*, 1996; Carvalho, *et al.*, 2003; Assis, *et al.*, 2011; Gadisa, *et al.*, 2012; Skhal, *et al.*, 2012; Cunningham, *et al.*, 2012; Peruhype-Maganhães, *et al.*, 2012; Abass, *et al.*, 2013; Boelaert, *et al.*, 2014), mas reatividade cruzada com os soros de pacientes com doenças relacionadas com LV, bem como com aqueles de indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas de LV, levaram a resultados falso-positivos nos ensaios serológicos (Sundar, *et al.*, 2002; Chappuis, *et al.*, 2007). Maia e colaboradores, em 2012, realizaram uma meta-análise para avaliar a eficiência do uso da rK39 no diagnóstico da LV e concluem sugerindo que para áreas endêmicas, uma vez constatada a impossibilidade de realizar a demonstração da *Leishmania* por meio de biópsias, o diagnóstico deve ser feito com o uso da rK39 e teste de aglutinação direta (DAT) antes do início do tratamento devido à variação da especificidade e sensibilidade desses testes demonstrada na literatura.

Em nosso estudo, todos os pacientes com LV apresentaram resultados de PCR positivo para *L. infantum*, mas seis deles não foram detectados quando

o teste imunocromatográfico rK39 foi aplicado. Em contraste, os oito clones foram reconhecidos corretamente pelos pacientes com LV. Além disso, nossos clones de fago mostraram um alto desempenho quando um ensaio de fago-ELISA foi desenvolvido, sugerindo que esses antígenos empregados neste imunoenensaio poderiam se tornar uma ferramenta importante para desenvolver uma plataforma sorológica para o diagnóstico de LV.

Em relação à sensibilidade e especificidade, o desempenho dos clones foi compatível com os parâmetros diagnósticos descritos para o sorodiagnóstico da LV canina (Costa, *et al*, 2014) e melhorou em relação a outros antígenos recombinantes, como rA2 (Ghedin, *et al*, 1997; Carvalho, *et al*, 2002, Farahmand, *et al*, 2011; Akhouni *et al*, 2013), rHSP83 (Celeste, *et al*, 2014) e rLiHyp1 (Martins, *et al*, 2013), que não foram avaliados ou não foram capazes para distinguir entre as diferentes formas clínicas da doença.

A antigenicidade é definida como a capacidade de um peptídeo ou antígeno inteiro ser reconhecido por um anticorpo específico (Goulart, *et al*, 2010). Grandes repertórios de sequências aleatórias exibidas na cápside do bacteriófago oferecem a vantagem de que um grande número de sequências pode ser rastreado em um tempo relativamente curto. Os peptídeos exibidos em fagos apresentam vantagens como uma antigenicidade efetiva (Manoutcharian, *et al*, 1999), amplificação simples e econômica, e o produto final é composto por um grande número de bacteriófagos que expressam mimótopos em sua superfície externa.

No nosso estudo, os fagos filamentosos de classe M13 foram utilizados para selecionar os clones antigênicos. Estes fagos pertencem a uma classe não lítica, na qual as bactérias não são lisadas durante processo de purificação; como consequência, uma baixa presença de endotoxinas contaminantes pode ser detectada e, além disso, pode ser removida usando kits comerciais (Danner, *et al*, 2001). Neste contexto, nossas moléculas podem ser consideradas como tendo uma pureza satisfatória a ser utilizada como antígenos num ensaio de fago-ELISA. Além disso, os clones de fagos também apresentam vantagens, como a exclusão potencial de sinais confusos de outros determinantes não diagnósticos, e as preparações purificadas podem ser armazenadas em tampões otimizados por meses a anos (Skurnik, *et al*, 2007).

Considerando-se trabalhos que demonstraram a capacidade de fagos selecionados por pela técnica do *Phage display* em promover uma resposta satisfatória como agente imunogênico em modelos murinos (Costa, *et al.*, 2017; Costa, *et al.*, 2015; Coelho, *et al.*, 2015; Costa, *et al.*, 2014) os fagos triados pelo bio-panning neste trabalho foram testados na imunização de camundongos frente a infecção pela *Leishmania infantum* com resultados promissores resultando na defesa de uma dissertação pelo programa de Infectologia e Medicina Tropical, UFMG (Ramos *et al.*, em processo de publicação).

Costa *et al.* (2017) avaliaram mimotopos de fagos selecionados em bio-panning frente aos soros de cães com LV sintomática utilizados com agente imunogênico para a LV (Costa, *et al.*,2014), como potenciais antígenos no diagnóstico sorológico de cães e humanos resultados promissores o que justifica a avaliação dos oito clones deste trabalho como potencial antígenos para o diagnóstico da LV canina.

Também é interessante notar que pelo menos dois resíduos de aminoácidos dentro dos sete peptídeos motivos foram compartilhados entre os oito clones selecionados, que levaram ao motivo de consenso TFLRSIVPS. Esta sequência está estruturalmente relacionada com as proteínas da membrana de *L. infantum* (Fig. 5), com o maior sucesso para uma proteína hipotética (XP_001464507.2), sugerindo também uma possível explicação para a reatividade ELISA encontrada quando os soros dos pacientes LV ativos foram avaliados, porém a avaliação empírica dessa proteína hipotética como antígeno para o sorodiagnóstico da LV deve ainda ser realizada.

Vale ressaltar também que proteínas de membrana do protozoário já foram descritas com potenciais agentes imunogênicos como a proteína de superfície acilada hidrófila B (HASP B) também reconhecida por anticorpos nos soros de indivíduos com as formas tegumentar e visceral da doença (Mortazavidehkordi,*et al.*, 2016; Mohapatra, *et al.*,2010). A proteína aqui identificada apresenta baixa similaridade quando tem sua sequência comparada com sequencias de proteínas presentes em protozoários da família *Trypanosomatidae*, possuindo um índice de identidade variando ente 56 a 30% entre esses organismos. Esse fato reforça a hipótese da predição por bioinformática do mimotopo consenso uma vez que os antígenos usados não

apresentaram reatividade cruzada para soros positivos DC demonstrando como a seleção negativa frente a DC foi eficiente.

O baixo número de amostras de soro de pacientes com LV, a ausência de populações de coortes independentes, incluindo outras doenças relacionadas com LV, como a malária, bem como a ausência de um acompanhamento serológico dos pacientes tratados, podem ser considerados fatores limitantes do presente estudo. No entanto, qualquer antígeno diagnóstico descrito na literatura não mostrou o desempenho diagnóstico perfeito como o observado neste trabalho quando os oito clones de fago foram avaliados, principalmente usando controles saudáveis endêmicos e não endêmicos distintos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que oito mimotopos antigênicos selecionados por meio da tecnologia de *Phage display* devem ser investigados em estudos futuros visando sua aplicação para um sorodiagnóstico sensível e específico da LV humana.

8 PERSPECTIVAS

O presente trabalho demonstrou que novas sequências peptídicas capazes de se ligarem a anticorpos presentes nos soros de pacientes com LV de maneira específica e propõem uma sequência consenso. Essas sequências serão sintetizadas e utilizadas, juntamente com os fagos que expressam cada uma delas, para novos ensaios de ELISA com um painel sorológico mais abrangente.

As proteínas da *L. infantum* identificadas nessa tese que possuem os peptídeos com maior sensibilidade e especificidade serão clonadas, expressas, purificadas e utilizadas como antígenos frente ao mesmo painel sorológico para sua avaliação comparativa no diagnóstico da LV.

Como o objetivo de comprovar a predição de bioinformática será realizado um *Phage display* utilizando os fagos relatados como alvos frente a uma biblioteca de fagos *naive*. Esse método permitirá a identificação das sequências peptídicas ligantes às aqui descritas e, conseqüentemente, a produção de anticorpos que apresentem esses peptídeos. Esses anticorpos monoclonais serão usados para a identificação das proteínas do protozoário que apresentem os mimotopos descritos neste trabalho por meio da imunofluorescência.

Portanto, espera-se encontrar um alvo ideal que possa ser produzido e testado em larga escala em uma plataforma de bioimpedância para teste rápido da LV humana.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abass E., Bollig N., Reinhard K., Camara B., Mansour D., Visekruna A., Lohoff M., Steinhoff U., a Novel *Leishmania donovani* – Derived Recombinant Immunodominant Protein for Sensitive Detection of Visceral Leishmaniasis in Sudan. PLoS NTDs. V. 7, e 2322 (2013)
- Akhoundi, B.; Mohebali, M.; Shojaee, S.; Jalali, M.; Kazemi, B.; Bandehpour, M.; *et al.*, Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*, Exp. Parasitol. v.133 p.307-313 (2013).
- Alban, S.M.; Moura, J.F.; Thomaz-Soccol, V.; Sékula, B.S.; ALVarenga, L.M.; Mira, M.T.; *et al.*, *Phage display* and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy, PLoS One. v.9 p.106-222 (2014).
- Alves, P.T, Fujimura, P. T, Morais, L. D. S., Goulart, L. R. Revisiting the CD14: epitope mapping by *Phage display*. Immunobiology 219: 822-829 (2014).
- Assis, T.S.M.; Braga, A.S.C.; Pedras, M.J.; Oliveira, E.; Barral, V.; Siqueira, I.C. *et al.*, Multi-centric prospective evaluation of rK39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. v.105 p.81-85 (2011).
- Badaro R., Benson D., Eulalio M. C., Freire M., Cunha S., Netto E. M., Pedral-Sampaio D., Madureira C., Burns J. M., Houghton R. .L., David J.R., Reed S.G. Rk39, a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J Inf Dis v.173 p.758–776 (1996).
- Badaró, R., Benson, D., Eulálio, M., C., Freire, M., Cunha, S., Netto, E., M., Pedral-Sampaio, D., Madureira, C., Burns, J., M., Houghton, R., L, David, J., R., Reed, S., G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J Infect Dis.173(3) p.758-61 (1996).

- Badaro, R.; Benson, D.; Eulalio, M.C.; Freire, M.; Cunha, S.; Netto, E.M.; *et al.*, rK39, a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis, *J. Infect. Dis.* v. 173 p.758-761 (1996).
- Boelaert M., El-Safi S., Hailu A., Mukhtar M., Rijal S., Sundar S., Wasunna M., Aseffa A., Mbui J., Menten J., Desjeux P., Peeling R. W. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Trans R Soc Trop Med Hyg* v.102 p.32–40 (2008).
- Boelaert, M.; Verdonck, K.; Jenten, M.; Tunyoto, S.; Van Griensven, J.; Chappuis, F.; *et al.*, Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease, *Cochrane Database Syst. Rev.* v.6 CD009135 (2014).
- Bradford, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* v. 72 p. 248-254 (1976).
- Carvalho, F.A.A.; Charest, H.; Tavares, C.A.P.; Matlashewski, G.; Valente, E.P.; Rabello, A.; *et al.*, Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 43 p.289-295 (2002).
- Carvalho, S.F.G.; Lemos, E.M.; Corey, R.; Dietze, R.; Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 68 p.321-324 (2003).
- Celeste, B.J.; Arroyo-Sanchez, M.C.; Ramos-Sanchez, E.M.; Castro, L.G.; Lima-Costa, F.A.; Goto, H.; Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniasis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.90 p.860-865 (2014).
- Chappuis. F.;sundar, S.; Hailu, A.; Ghailb. H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; ALVar, J.; Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology.* v.5 p.873-882 (2007).
- Coelho, E., A., Chávez-Fumagalli, M., A., Costa, L., E., Tavares, C., A., Soto, M., Goulart, L., R., Theranostic applications of phage display to control

leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 48 370-397(2015).

Coelho, E.A.F.; Tavares, C.A.; Carvalho, F.A.; Chaves, K.F.; Teixeira, K.N.; Rodrigues, R.C.; *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.71p. 3988-3994 (2003).

Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2012 Jan;6(1) p 1484. (2012)

Conti, R. V.; Lane, v. F. M.; Montebello, L.; Pinto-Junior, V. L.; Visceral Leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. J. Vector Borne Dis. v.53 p. 99-104. (2016).

Costa L., E., Salles, B.,C.,S., Santos, T.,T.,O., Ramos, F.,F., Lima, M., P., Lima, M., I.,S.,, Portela, Á.,S.,B., Chávez-Fumagalli, M.,A., Duarte, M.,C., Menezes-Souza, D., Machado-de-Ávila, R.,A., Silveira, J.,A.,G., Magalhães-Soares, D.,F., Goulart, L.,R., Coelho, E.,A.,F. Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis, Microbial Pathogenesis. (2017).

Costa, L., E., Salles, B., C., Alves, P., T., Dias, A., C., Vaz, E., R., Ramos, F., F., Menezes-Souza, D., Duarte, M., C., Roatt, B., M., Chávez-Fumagalli, M., A., Tavares, C., A., Gonçalves, D., U., Rocha, M., O., Goulart, L., R., Coelho, E., A., New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. J Immunol Methods. 434 p 39-45 (2016).

Costa, L.E.; Lima, M.I.S.; Chávez-Fumagalli, M.A.; Menezes-Souza, D.; Martins, V.T.; Duarte, M.C.; *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- p.96-106 (2014).

Cramer R., Suter M.. Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene

products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* v.137 p.69-75 (1993).

Cunningham, J.; Hasker, E.; Das, P.; El Safi, S.; Goto, H.; Mondal, D.; *et al.*, A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis, *Clin. Infect. Dis.* v.55 p.1312-1319 (2012).

Danner, S.; Belasco, J.G.; *T7 Phage display*: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.98 p.12954-12959 (2001).

De Pablos, L. M.; Ferreira, T. R.; Walrad, P. D.; Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. *Current Opinion in Microbiology.* v. 34 p.82-89. (2016).

Deniau M., Canavate C., Faraut-Gambarelli F., Marty P.. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol* v. 97 p.115–133. (2003).

Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A., S., Lavigne, R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci.* 13(8) p 699-722 (2012).

Dupnik, K. M.; Nascimento, E. L.; Rodrigues-Neto, J. F.; Keesen, T.; Fernandes, M. Z.; Duarte, I.; Jeronimo, S. M. B.; New challenges in the epidemiology and treatment of visceral leishmaniasis in periurban areas. *Drug. Dev.* v.72(6) p.451-462. (2011).

Ebrahimizadeh, W., Rajabibazl, M. Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application. *Curr Microbiol.*, 69(2) p. 09-20 (2014).

Farahmand, M.; Shirazi, H.A.; Nahrevanian, H.; Hajjarian, H.; Molecular analysis of A2-genes encoding stage-specific S antigen-like proteins among isolates from Iranian cutaneous and visceral leishmaniasis, *Iranian J. Basic Med. Sci.* v.14 p.407-413 (2011).

Filippov, A., A., Sergueev, K., V., He, Y., Huang, X., Z., Gnade, B., T., Mueller, A., J., Fernandez-Prada, C., M., Nikolich, M., P., Bacteriophage therapy of

- experimental bubonic plague in mice. *Adv Exp Med Biol.* 54 p 337-48 (2012).
- Gadisa, E.; Custodio, E.; Cañavate, C.; Sordo, L.; Zbebe, A.; Nieto, J.; *et al.*, Usefulness of the rK39-immunochromatographic test, direct agglutination test, and leishmanin skin test for detecting asymptomatic *Leishmania* infection in children in a new visceral leishmaniasis focus in Amhara State, Ethiopia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.86 p. 792-798 (2012).
- Ghedini, E.; Zhang, W.W.; Charest, H.; Sundar, S.; Kenney, R.T.; Matlashewski, G.; Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* v.4 p.530-535 (1997).
- Goulart, L.R.; Vieira, C.U.; Freschi, A.P.; Capparelli, F.E.; Fujimura, P.T.; Imeida, A J.F.; *et al.*, Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms, *Crit. Rev. Immunol.* v.30 p. 201-222 (2010).
- Handman, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews.* v. 14 p. 229-243. (2001).
- Harhay M.,O, Olliaro P.,L. , Costa DL, Costa C., H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* ;27:403-9 (2011)
- Harhy. M. O.; Olliaro, P. L.; Costa, D. L.; Costa, C. H. N.; Urban parasitology: visceral Leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology* V. 27 p. 403-409. (2011).
- Kaye, P.; scott, P.; Leishmaniasis: complexity at thre hosdt-pathogen interface. *Nature Reviews – Microbiology.* v. 9 p. 604- 615. (2011).
- Kumar, R., Engwerda, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology.* 2014 Mar 14;3(3) p 1-13 (2014).
- Lainson, R., Rangel, E. F.; *Lutzomyia longipalpis* and eco-epidemiology of American visceral Leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* v. 100(8), p. 811-827. (2005).
- Lainson, R., Shaw, J., J., Silveira, F., T., Fraiha, H. Leishmaniasis in Brazil. XIX: visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the presence of

- Lutzomyia longipalpis* on the Island of Marajó, Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77(3) p 323-30 (1983).
- Lainson, R., The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Royal Society of Tropical Med. and Hygiene.* V. 77, p. 569-596. (1893).
- Lainson. R., Rangel, E.,F., *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(8):811-27 (2005).
- Le Joncour ,V., Laakkonen , P. Seek & Destroy, use of targeting peptides for cancer detection and drug delivery. *Bioorg Med Chem.* (17) p 31109-4 (2017).
- Løset, G., Å., Roos, N., Bogen ,B., Sandlie, I. Expanding the versatility of phage display II: improved affinity selection of folded domains on protein VII and IX of the filamentous phage. *PLoS One.* 24;6(2) p17433 (2011).
- Lu, T., K., Collins, J., J., Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 24;106(12) p 4629-34 (2009).
- Maia, Z., Lírio, M., Mistro, S., Mendes, C., M., Mehta, S., R., Badaro, R., Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 Jan;6(1) p 1484. (2012)
- Manoutcharian, K.; Terrazas, L.I.; Gevorkian, G.; Acero, G.; Petrossian, P.; Rodriguez, M.; *et al.*, Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis, *Infect. Immun.* v.67 p.4764-4770 (1999).
- Martins, V.T.; Chávez-Fumagalli, M.A.; Costa, L.E.; Canavaci, A.M.C.; Martins, A.M.C.C.; Lage, D.P.; *et al.*, Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v.7 2148 (2013).

- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Visceral: Recomendações clínicas para a redução da letalidade. Serie A. Normas e manuais técnicos. Brasília. 78 (2011).
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Brasília, 2005.
- Mohapatra, T.M.; Singh, D.P.; Sen, M.R.; Bharti, K.; Sundar, S.; Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis, *J. Infect. Dev. Ctries.* v. 4 p.114-117 (2010).
- Mohebbali, M.; Edrissian, G.H.; Shirzadi, M.R.; Hosseingholizadeh, G.; Pashaei, M.H.; Ganji, A.; *et al.*, Integrated visceral leishmaniasis surveillance system in primary care for children in Meshkin-Shahr district, north-western Islamic Republic of Iran, *East. Mediterr. Health.* v.16 p.1050-1054 (2010).
- Mortazavidehkordi, N., Farjadfar, A., Khanahmad, H., Ghayour-Najafabadi, Z., Hashemi, N., Fallah, A., Najafi, A., Kia, V., Hejazi, S., H. Evaluation of a novel lentiviral vaccine expressing KMP11-HASPB fusion protein against *Leishmania infantum* in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 38(11) p 670-677 (2016).
- Moura, G. S.; Saantos, A. M. dos; Aquino, D. M. C. de; SiLVa, A. A. M. da; Caldas, A. J. M.; Factors associated with a symptomatic infection in family members and neighbors of patients with visceral Leishmaniasis. *Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro.* v. 28 (12) p. 2306-2314 (2012).
- Nylén, S; Sacks, D; Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral Leishmaniasis. *Trends in Immunology*, v.28 p.378-384. (2007)
- Peruhype-Magalhães, V; Machado-de-Assis, T.S.; Rabello, A.; Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.107 p.951-952 (2012).
- Peters, N., C., Sacks, D., L., The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.* 2009 11 p.1290-6. (2009)

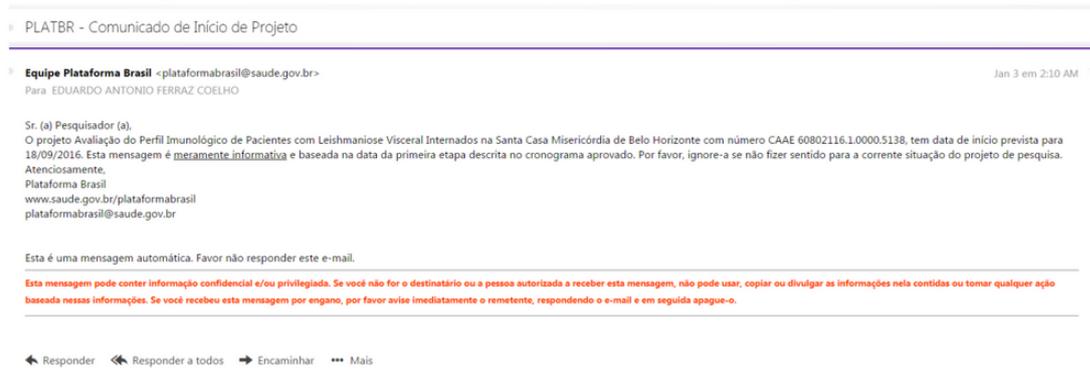
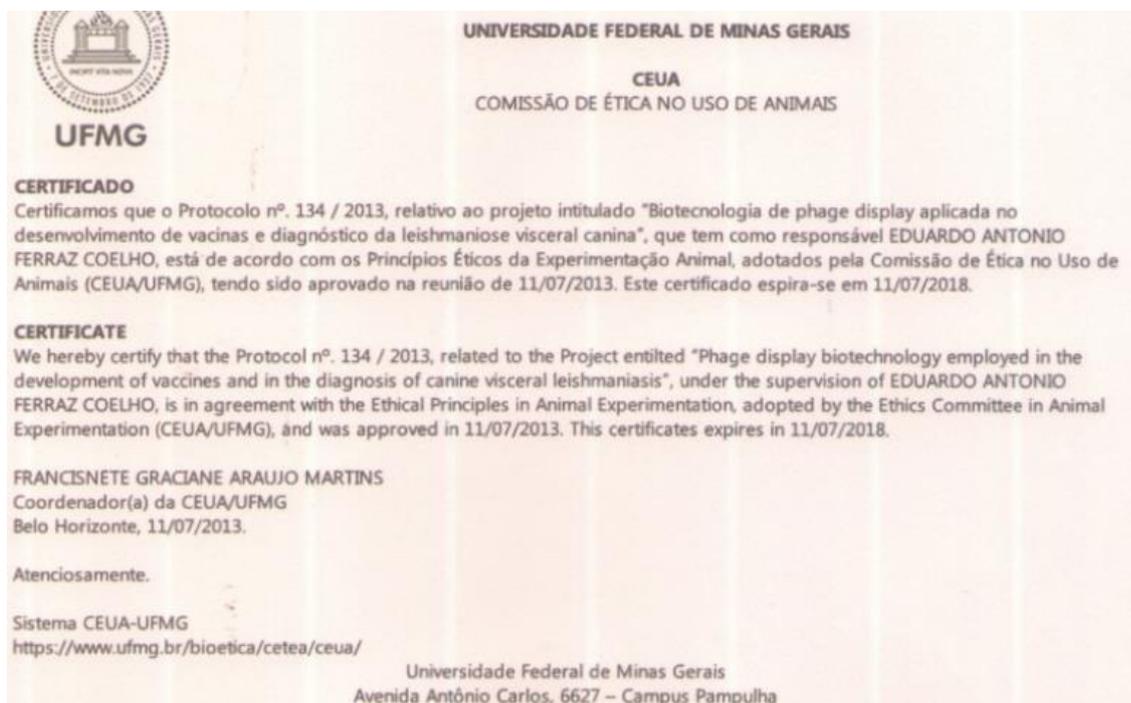
- Rakonjac, J., Bennett, N.,J., Spagnuolo, J., Gagic, D., Russel, M. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol.* 13(2) p 51-76 (2011).
- Rhaiem, R., B., Houimel, M., Targeting *Leishmania major* parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. *Acta Trop.* 59 p11-9 (2016).
- Rodi, D.J.; Makowski, L.; Phage-display technology-finding a needle in a vast molecular haystack, *Curr. Opin. Biotechnol.* v.10 p.87-93(1999).
- Rodrigues, V., Cordeiro-da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R., Estaquier, J., Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors.*1;9:118 p.1-13 (2016).
- Sakhal, L.; Mekki, S.; Ben-Abda, I.; Mousli, M.; Fmri, A.; Aoun, K.; *et al.*, Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on crude *Leishmania* histone proteins for serodiagnosis of human infantile visceral leishmaniasis, *Clin. Vaccine Immunol.* v.19 p.1487-1491(2012).
- Salmond, G., P., Fineran, P., C. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol.*13(12) p 777-86 (2015).
- Siddig M., Ghalib H., Shillington D. C., Petersen E. A. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* v. 82 p.66–68 (1988).
- Singh D.P., Goyal R. K., Singh R .K., Sundar S., Mohapatra T.M. In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of kala azar. *J Health Popul Nutr* v. 28 p.281–285 (2010).
- Sivakumar, R.; Sharma, P.; Chang, K.P.; Singh, S.; Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*, *Protein Expr. Purif.* v.46 p.156-165 (2006).
- Skurnik, M.; Pajunen, M.; Kiljunen, S.; Biotechnological challenges of phage therapy, *Biotechnol. Lett.* v. 29 p.995-1003 (2007).
- Smith G.P., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, p. 1315-1317, (1985).

- Srividya, G., Kulshrestha A., Singh, R., Salotra, P., Diagnosis of visceral Leishmaniasis: developments over last decade. *Parasitol. Res.*; v 110 p. 1065-1078 (2012).
- Stanley, A., C., Engwerda, C., R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol.* 85 p.138-47 (2007).
- Sundar, S., Rai, M., Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(5) p 951-8 (2002).
- Suo, S.; Wang, X.; Zarlenga, D.; Bu, R.E.; Ren, Y.; Ren, X.; *Phage display* for identifying peptides that bind the spike protein of transmissible gastroenteritis virus and possess diagnostic potential. *Virus Genes.* v. 51p. 51-56 (2015).
- Takagi, H.; Islam, M.Z.; Itoh, M.; Islam, A.U.; Saifuddin, E.A.R.; Hussain, S.M.; *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).
- Thalhofer, C., J., Chen, Y., Sudan, B., Love-Homan, L., Wilson, M., E. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infect Immun.* 79 p.108-17(2011)
- Ueno, N., Bratt, C., L., Rodriguez, N., E., Wilson, M., E. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes. *Cell Microbiol.* 11 p.1827-41 (2009).
- Wang G, Li X, Wang Z APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 37: D933 (2009).
- World Health Organization. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. Leishmaniasis Report Number 5. p. 1-8 (2017).
- World Health Organization. Weekly epidemiological record: Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. n. 22 p.285-296. (2016).

Zijlstra E. E, Nur Y., Desjeux P., Khalil E. A. G., El-Hassan A. M., Groen J.
Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test:
experience from the Sudan. Trop Med Inter Health v.6 p.108-113 (2001).

10 ANEXOS

10.1 REGISTRO NO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

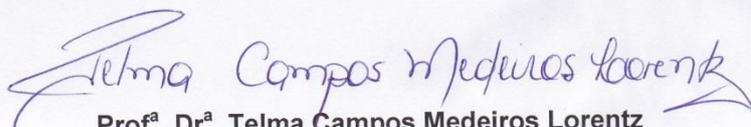
Projeto: CAAE – 32343114.9.0000.5149

**Interessado(a): Prof^a. Denise Utsch Gonçalves
Depto. de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Faculdade de Medicina- UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de setembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação longitudinal clínica e imunológica de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa da região metropolitana de Belo Horizonte" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


**Prof^a. Dr^a. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG**

10.2 REGISTRO DE PATENTE DEPOSITADA DOS MIMOTOPOS

https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController ☆ 📄 🏠 📧 ☰

 BRASIL | Acesso à informação ☰

Instituto Nacional da
Propriedade Industrial
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

Consulta à Base de Dados do INPI [Início | Ajuda?]

RESULTADO DA PESQUISA (22/11/2016 às 12:38:13)

Pesquisa por:
Nº Pedido: 'BR1020150318626' \Todas as palavras: '(PATENTE NACIONAL) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA, E USO' no Título' \

AVISO: Nº Pedido: 'BR1020150318626' \Todas as palavras: '(PATENTE NACIONAL) PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA, E USO' no Título' \ consta em nosso banco de dados. Por favor, acesse regularmente a Revista da Propriedade Industrial (RPI), a fim de acompanhar as publicações relativas ao pedido em questão.

O INPI disponibiliza ferramenta acessória de acompanhamento de processos. Caso deseje acompanhar publicações relativas a este pedido, a partir de hoje, siga os seguintes passos:

- 1º Retorne à página inicial da ferramenta de busca;
- 2º Entre com seu login e senha;
- 3º Busque novamente pelo processo; e
- 4º Clique em Meus pedidos.

O login e a senha são os mesmos utilizados para emitir Guias de Recolhimento da União. Mantenha o seu e-mail atualizado no cadastro do INPI

Dados atualizados até **22/11/2016** - Nº da Revista: **2394**

Rua Mayrink Veiga, 9 - Centro - RJ - CEP: 20090-910 | Rua São Bento, 1 - Centro - RJ - CEP: 20090-010



10.3 ARTIGO PUBLICADO COM OS DADOS DA TESE

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 87 (2017) 219–225



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio



Leishmania infantum mimotopes and a phage–ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis



Beatriz C.S. Salles ^{a,1}, Lourena E. Costa ^{a,1}, Patrícia T. Alves ^b, Ana C.S. Dias ^b, Emília R. Vaz ^b, Daniel Menezes-Souza ^{a,c}, Fernanda F. Ramos ^a, Mariana C. Duarte ^{a,c}, Bruno M. Roatt ^c, Miguel A. Chávez-Fumagalli ^a, Carlos A.P. Tavares ^d, Denise U. Gonçalves ^a, Regina L. Rocha ^a, Luiz R. Goulart ^{b,e,*}, Eduardo A.F. Coelho ^{a,c,**,2}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Amazonas s/n, Campus Umuarama, Bloco 2E, Sala 248, 38400-002, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Patologia Clínica, Coltec, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^e Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California-Davis, 95616, Davis, CA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2016

Received in revised form 17 October 2016

Accepted 21 November 2016

Available online 27 November 2016

Keywords:

Visceral leishmaniasis

Serodiagnosis

Mimotopes

Phage display

Phage-ELISA

Specificity

ABSTRACT

Serological methods used to diagnose visceral leishmaniasis (VL) are considered minimally invasive, but they present problems related with their sensitivity and/or specificity. In this study, a subtractive selection using the phage display technology against antibodies from healthy subjects living in endemic and non-endemic areas of disease, as well as from Chagas disease patients and those developing active VL, was developed. The aim of this study was to select bacteriophage-fused epitopes to be used in the serodiagnosis of human VL. Eight phage clones were selected after the bio-panning rounds, and their reactivity was evaluated in a phage-ELISA assay against a human serological panel. A wild-type clone and the recombinant K39-based immunochromatographic test were used as controls. In the results, it was shown that all clones showed an excellent performance to serologically identify VL patients, demonstrating the feasibility of the isolated phages for developing a specific and sensitive serodiagnosis of human VL.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is a parasitic disease complex occurring in tropical and subtropical countries worldwide (World Health Organization, 2010). Among the 2 million of cases of the human leishmaniasis, between 200,000 and 400,000 correspond to cases from visceral leishmaniasis (VL), culminating in approximately 20,000 to 30,000 deaths annually (Alvar et al., 2012; Desjeux, 2004). *Leishmania* parasites are distributed in the world, and in some geographic areas, more than one species can be found causing distinct clinical manifestations of the disease. In the Americas, Brazil is responsible by 90% of the cases registered of VL, and *Leishmania infantum* species is the most common parasite responsible by this disease in Brazilian dogs and humans (Alvar et al., 2012).

The human infection outcome varies from an asymptomatic and/or subclinical disease to the acute symptomatic disease. While infected subjects developing asymptomatic VL present apparently no impact on their healthy state, symptomatic patients usually develop diverse clinical manifestations, such as lymphadenopathy, fever, diarrhea, malaise, hepatomegaly, and splenomegaly (Michel et al., 2011; Sundar and Chakravarty, 2010). Chemotherapy treatment for VL has been based on parenteral administration of pentavalent antimonials, but several side effects such as anorexia, myalgia, fever, urticaria, and arthralgia, besides toxicity in the liver, spleen, and kidneys, have been registered in the patients (Chávez-Fumagalli et al., 2015; Moore and Lockwood, 2010).

A precise diagnosis of VL may allow to a faster and more effective treatment against the disease, which increases the possibility of cure, as well as to induce less toxic effects due to a lower time exposition for the chemotherapeutics. However, the parasitological diagnosis based on direct demonstration of *Leishmania* amastigotes presents low sensitivity and requires invasive samples collection procedures, which limit their use (Srividya et al., 2012; Tavares et al., 2003). Although the detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction (PCR) technique possesses high specificity, its sensitivity remains variable

* Corresponding author. Tel.: +55-34-3225-8440.

** Corresponding author. Tel.: +55-31-3409-4983.

E-mail addresses: lgoulart@ufu.br (L.R. Goulart), eduardofracceho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Co-senior authors.