

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

**FERNANDA FONSECA RAMOS**

**Avaliação da imunogenicidade e eficácia protetora  
induzida por bacteriófagos recombinantes  
selecionados pela tecnologia de *Phage Display* em  
camundongos BALB/c contra a infecção por  
*Leishmania infantum***

Belo Horizonte

2017

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

**FERNANDA FONSECA RAMOS**

**Avaliação da imunogenicidade e eficácia protetora  
induzida por bacteriófagos recombinantes selecionados  
pela tecnologia de *Phage Display* em camundongos  
BALB/c contra a infecção por *Leishmania infantum***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da UFMG, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre no referido Programa.

Orientadores: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho  
Dra. Lourena Emanuele Costa

Belo Horizonte  
2017

R175a Ramos, Fernanda Fonseca.  
Avaliação da imunogenicidade e eficácia protetora induzida por bacteriófagos recombinantes selecionados pela tecnologia de Phage Display em camundongos BALB/c contra a infecção por *Leishmania infantum* [manuscrito]. / Fernanda Fonseca Ramos. - - Belo Horizonte: 2017.  
82f.: il.  
Orientadores: Eduardo Antônio Ferraz Coelho; Lourena Emanuele Costa.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leucócitos Mononucleares. 2. Sangue. 3. Leishmaniose Visceral. 4. Técnicas de Visualização da Superfície Celular. 5. Imunogenicidade da Vacina. 6. Imunidade nas Mucosas. 7. Vacinas. 8. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. II. Costa, Lourena Emanuele. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 200

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



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

UFMG

## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA FERNANDA FONSECA RAMOS

Realizou-se, no dia 06 de dezembro de 2017, às 14:00 horas, sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 325ª defesa de dissertação, intitulada "*Avaliação da imunogenicidade e eficácia protetora induzida por bacteriófagos recombinantes selecionados pela tecnologia de Phage Display em camundongos BALB/c contra a infecção por Leishmania infantum*", apresentada por FERNANDA FONSECA RAMOS, número de registro 2016714756, graduada no curso de FARMACIA-NOTURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Orientador (UFMG), Dra. Lourena Emanuele Costa – Orientadora (UFMG), Dra. Ana Thereza Chaves (UFMG), Prof. André Gustavo Tempone (Instituto Adolfo Lutz).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 06 de dezembro de 2017.

  
Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

  
Dra. Lourena Emanuele Costa

  
Dra. Ana Thereza Chaves

  
Prof. André Gustavo Tempone

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitor:** Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

**Vice-reitora:** Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

**Pró-reitora de Pós-graduação:** Prof. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

**Pró-reitor de Pesquisa:** Prof. Dr. Ado Jório

### **FACULDADE DE MEDICINA**

**Diretor:** Prof. Dr. Tarcízio Afonso Nunes

**Vice-diretor:** Prof. Dr. Humberto José Alves

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

**Subcoordenador do Centro de Pós-graduação:** Prof. Selmo Geber

### **CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Área de Concentração:** Infectologia e Medicina Tropical

**Coordenador:** Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

**Vice Coordenador:** Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

### **MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO**

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Profa. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof. Unai Tupinambás

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

Thaís Teodoro de Oliveira Santos (representante discente)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses (LBAEL), no Departamento de Patologia Clínica do COLTEC, da Universidade Federal de Minas Gerais e, no Laboratório de Infectologia e Medicina Tropical, do Programa de Pós-graduação em Ciência da Saúde da Faculdade de Medicina da UFMG; sob a orientação do prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho e da Dra. Lourena Emanuele Costa, ambos da UFMG.

## **COLABORADORES**

Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira<sup>1,2</sup>

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart<sup>3,4</sup>

- 1 Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- 2 Programa de Neuropsiquiatria, do Departamento de Psiquiatria e Ciências Comportamentais, McGovern Medical School, da Universidade do Texas Health Science Center em Houston (UTHealth), Houston, TX, USA.
- 3 Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.
- 4 Departamento de Microbiologia Médica e Imunologia da Universidade da Califórnia-Davis, 95616, Davis, CA, USA.

## **SUPORTE FINANCEIRO**

Esse projeto recebeu apoio financeiro da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Edital 02/2017), Coltec/UFMG, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho à minha família, que tanto torce pelo meu sucesso. Aos pacientes acometidos por essa doença, que sofrem e anseiam por avanços na medicina e na biotecnologia a fim de melhores cuidados e qualidade de vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por representar tudo o que me norteia, por ser meu amparo, motivo de gratidão e perseverança em cada passo da minha vida;

Aos meus pais, Fernando e Imaculada e, seus cônjuges, Júnia e Agnelo, por serem meu lar, meus exemplos de valores, e por me mostrarem a importância do estudo para crescimento pessoal e profissional;

Aos meus irmãos, Igor, Ítalo e João Victor, meus pilares e companheiros, por seus sorrisos e aconchego;

Aos meus avós, José, Zélia e, Eliene (*in memoriam*), por me ensinarem o significado de perseverança e paixão pela vida, por me incentivarem a nunca desistir e a sempre trabalhar para ser uma melhor pessoa e profissional;

Ao meu namorado, Guilherme, por ser meu parceiro, meu abraço. Agradeço pela força, pelos conselhos e por sua família que tanto me acolheu;

À toda minha família e amigos, em especial à Carol, Camila e Cacau, por todo carinho, apoio e momentos de alegria;

Aos meus orientadores, Eduardo, por abrir portas e meus olhos para a pesquisa. Por me ensinar e confiar no meu trabalho, além de me proporcionar a realização desse projeto; e Lourena, por me acolher e me ensinar tanto sobre *Phage* e leishmanioses;

Aos colaboradores, por todo auxílio neste trabalho. Em especial ao Prof. Beto, por toda sua representatividade e história no nosso Lab., ao Jamil, por toda paciência, sorriso e sua disponibilidade em ajudar; ao Prof. Antônio Lúcio e Erica, por todo carinho e kits disponibilizados; ao Prof. Luiz Ricardo e ao lab de Uberlândia, pelo auxílio desde sempre no *Phage*, bioinformática e, aos professores Bruno Roatt e Daniel Menezes e, ao Miguel Fumagalli, pelo ensino e auxílio nos experimentos;

Aos colegas de laboratório, LIMT e LBAEL-Coltec, por me darem apoio e auxílio nos experimentos, compartilharem conhecimento e momentos. Por serem meu time, meu local de trabalho, de conversas, confidências e novas amizades: Marcella, Dani,



Thaís, Bia, Daniel D., Paty, Grasi, Vivi, Dani V., Ana Maria, Aquila, Debs, Mari D., Mari P., Fe, Gui, Kei, Lucas, Anna Lets, Joana, JP e Re;

À minha amiga Marcella, por ser minha companheira de faculdade e Lab desde o início, por sempre me ouvir, me amparar e me apoiar;

À UFMG, por ser minha segunda casa durante anos, na graduação e no mestrado. Por tudo que aprendi, vivi e a profissional que me tornei;

Ao Programa de Pós-graduação e às instituições de auxílio à pesquisa, por possibilitarem a realização deste sonho.

Muito obrigada!

“A saúde é um dom de Deus, e a prevenção de doenças é o meio de demonstrarmos nossa gratidão”.

*Autor desconhecido*

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária que apresenta elevada incidência no Brasil e que, se não tratada, pode levar à morte. A prevenção e o controle da doença são importantes, porém, apresentam problemas devido à dificuldade na interrupção do ciclo do vetor, à toxicidade dos medicamentos utilizados e à ausência de vacinas humanas. Assim, o desenvolvimento de vacinas para a profilaxia da LV é uma necessidade significativa e a utilização de novas tecnologias, tais como *Phage Display*, pode proporcionar o alcance de novos alvos vacinais. No presente estudo, a técnica de *Phage Display* foi empregada para selecionar bacteriófagos com peptídeos expostos em sua superfície e que foram específicos para anticorpos IgG de pacientes com LV assintomática e sintomática, e que não foram reconhecidos por anticorpos de indivíduos não infectados. Os clones de fagos selecionados foram utilizados como estímulos de células mononucleares do sangue periférico obtidas de indivíduos saudáveis e pacientes com LV e, aqueles com razão elevada de IFN- $\gamma$ /IL-10 foram selecionados para os ensaios de vacinação. Dentre 25 clones obtidos nos ciclos de *biopannings*, dois foram selecionados devido à razão entre IFN- $\gamma$  e IL-10 ter sido maior que 3,0, sendo chamados de clones B1 e D11, para os experimentos de vacinação em camundongos BALB/c, com o objetivo de validar sua eficácia protetora contra a infecção por *Leishmania infantum*. Verificou-se que ambos os clones induziram proteção significativa contra a infecção, que foi evidenciada pela redução do parasitismo em todos os órgãos avaliados: baço, linfonodo drenante, medula óssea e fígado; sendo tal processo mediado por uma resposta imune do tipo Th1 específica. O presente estudo tem caráter inovador ao empregar uma estratégia racional baseada em testes *in vitro* e *in vivo* com bacteriófagos recombinantes a fim de se selecionar novos e promissores imunógenos contra a LV.

**Palavras-chave:** Células mononucleares do sangue periférico; leishmaniose visceral humana; *Phage Display*; resposta imune; vacina.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease that has a high incidence in Brazil and, if untreated, can lead to death. The prevention and control of the disease are important, but they present problems due to the difficulty in interrupting the vector cycle, the toxicity of the drugs used and the absence of human vaccines. Therefore, the development of vaccines for the prophylaxis of VL is a meaningfully needed and the use of new technologies, such as Phage Display, can provide the search of new vaccine targets. In the present study, the Phage Display technique was used to select bacteriophages with peptides exposed on their surface that were specific for IgG antibodies from patients with symptomatic asymptomatic VL and that were not recognized by antibodies from uninfected individuals. Selected phage clones were used as peripheral blood mononuclear cell stimuli obtained from healthy and VL patients, and those with high IFN- $\gamma$  / IL-10 ratio were selected for the vaccination assays. Among the 25 clones obtained in the *biopannings* cycles, two were selected because the ratio IFN- $\gamma$  and IL-10 was greater than 3.0, being called clones B1 and D11, for the vaccination experiments in BALB / c mice, with the aim of validating its protective efficacy against *Leishmania infantum* infection. It was found that both clones induced significant protection against the infection, evidenced by the reduction of parasitism in all evaluated organs: spleen, draining lymph node, bone marrow and liver, process mediated by a specific Th1-type immune response. The present study is innovative as it employs a rational strategy based on *in vitro* and *in vivo* tests with recombinant bacteriophages in order to select new and promising immunogens against VL.

**Keywords:** Peripheral blood mononuclear cells; human visceral leishmaniasis; *Phage Display*; immune response; vaccine.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
/	Razão
>	Maior
±	Mais ou menos
μM	Micromolar
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais de Pesquisa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COLTEC	Colégio Técnico
ConA	Concanavalina A
DC	<i>Dendritic cells</i> (Célula dendríticas)
DMEM	<i>Dulbecco modification of Minimum Essential Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
Ff	Fago filamentoso
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
M	Molar
M13	Fago filamentoso classe M13
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> (Anticorpo monoclonal)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil
mg	Miligrama

mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde do Brasil
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido Nítrico)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OPD	<i>Ortho-phenylenediamine dihydrochloride</i> (orto-fenilenodiamino dihidroclorato)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão salina fosfato)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da Polimerase)
PEG	Polietilenoglicol
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PRL	Programa Regional de Leishmanioses
rK29	Antígeno recombinante rK29
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Real time-PCR</i> (PCR em tempo real)
SFB	Soro fetal bovino
SLA	<i>Soluble Leishmania antigen</i> (Extrato solúvel de <i>Leishmania</i> )
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tampão tris salina)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
Th1	T <i>Helper</i> 1
Th2	T <i>Helper</i> 2
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-alfa</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1.</b> Formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita) do protozoário Leishmania. ....	22
<b>Figura 2.</b> Ciclo de biológico do parasito Leishmania. ....	23
<b>Figura 3.</b> Incidência de leishmaniose visceral no mundo em 2015. ....	24
<b>Figura 4.</b> Casos de leishmaniose visceral, segundo países das Américas com maior ocorrência de casos, 2001-2015. ....	25
<b>Figura 5.</b> Casos de leishmaniose visceral registrados no Brasil por Unidade Federativa, 2015. ....	25
<b>Figura 6.</b> Estrutura do fago filamentosso M13 (A). Ciclo de Biopanning (B). ....	36
<b>Figura 7.</b> Fluxograma da sequência de experimentos realizada no projeto. ....	39
<b>Figura 8.</b> Fluxograma do experimento de imunização. ....	46
<b>Figura 9.</b> Índice de seletividade e especificidade dos fagos utilizados como estímulos de PBMCs. ....	52
<b>Figura 10.</b> Sequência da proteína utilizada na predição. ....	53
<b>Figura 11.</b> Estrutura tridimensional da proteína cinase inositol polifosfato. Modelagem molecular 1. ....	54
<b>Figura 12.</b> Estrutura tridimensional da proteína cinase inositol polifosfato. Modelagem molecular 2. ....	54
<b>Figura 13.</b> Produção de citocinas nos camundongos vacinados. ....	55
<b>Figura 14.</b> Resposta celular dos animais vacinados após a infecção desafio. ....	56
<b>Figura 15.</b> Frequência de citocinas Intracitoplasmáticas produzidas por células T após estímulo com SLA L. infantum. ....	57
<b>Figura 16.</b> Análise do envolvimento de células TCD4+ e TCD8+ na produção de IFN- $\gamma$ . ....	58
<b>Figura 17.</b> Avaliação da ativação de macrófagos nos animais vacinados e infectados. ....	59
<b>Figura 18.</b> Resposta humoral específica aos fagos e parasitos, antes e após a infecção. ....	60
<b>Figura 19.</b> Avaliação da carga parasitária nos animais vacinados e infectados pela técnica de diluição limitante. ....	61
<b>Figura 20.</b> Carga parasitária esplênica avaliada por RT-PCR. ....	62

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Tabela 1.** Caracterização dos peptídeos miméticos de antígenos de *Leishmania infantum* selecionados por *Phage Display*. .....52
- Tabela 2.** Alinhamento Básico Local (BLASTp-NCBI) de peptídeos selecionados com banco de dados da proteína de *Leishmania infantum* cepa JPCM5, antígenos preditivos e suas funções. ....53



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
2.1. Etiologia e o ciclo biológico .....	22
2.2. Epidemiologia .....	24
2.3. Manifestações Clínicas da Leishmaniose Visceral .....	26
2.4. Medidas de controle.....	27
2.5. Imunologia na Leishmaniose Visceral.....	29
2.6. Desenvolvimento de vacinas .....	32
2.7. Técnica de Phage Display .....	34
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos .....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1. Aspectos Éticos.....	39
4.2. Delineamento do projeto .....	39
4.3. Amostras de sangue .....	40
4.4. Phage Display .....	40
4.4.1. Ciclos de Biopanning .....	40
4.4.2. Amplificação individual dos fagos selecionados .....	41
4.5. Parasitos .....	42
4.6. Avaliação <i>in vitro</i> da imunogenicidade dos fagos .....	42
4.6.1. Obtenção de PBMCs .....	42
4.6.2. Ensaio <i>in vitro</i> .....	43
4.6.3. ELISA de captura.....	43
4.7. Análises por Bioinformática.....	44
4.8. Ensaio <i>in vivo</i> .....	45
4.8.1. Imunização de camundongos.....	45
4.8.2. Avaliação de citocinas extracelulares .....	46
4.8.3. Avaliação de citocinas intracelulares .....	47
4.8.4. Produção de óxido nítrico .....	48
4.8.5. Resposta humoral.....	48

4.8.6. Carga Parasitária.....	49
4.9. Análise Estatística.....	50
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
5.1. Seleção de clones por <i>Phage Display</i> .....	51
5.2. Avaliação da imunogenicidade dos fagos pela estimulação <i>in vitro</i> de PBMCs 51	
5.3. Bioinformática .....	52
5.4. Experimento in vivo.....	55
5.4.1. Resposta celular.....	55
5.4.1.1. Produção de citocinas .....	55
5.4.1.2. Ativação de macrófagos .....	59
5.4.2. Resposta Humoral.....	60
5.4.3. Carga Parasitária.....	61
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>68</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>79</b>
ANEXO 1. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP).....	79
ANEXO 2. Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Pesquisa da UFMG (CEUA).....	80
ANEXO 3. Comprovante de submissão do artigo.....	81
ANEXO 4. Comprovante de depósito de patente.....	82

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida por um vetor do gênero *Lutzomyia* nas Américas e possui alguns animais como reservatórios, sendo as raposas e os marsupiais como exemplos de reservatórios silvestres e os cães como reservatórios domésticos, fatos que contribuem para a manutenção da doença no ambiente urbano e periurbano (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; MS, 2015; PALATNIK-DE-SOUSA, 2008).

A doença apresenta elevada expansão mundial, com cerca de 600 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas em 98 países (OMS, 2016), sendo registrados, anualmente, cerca de 200.000 a 500.000 casos de LV (ALVAR *et al.*, 2012; OPAS\_OMS, 2017). Por ser um problema de saúde pública e endêmica no Brasil, houve a necessidade de criação de um programa epidemiológico e profilático de combate à LV, que foi composto por três medidas principais: (i) o diagnóstico clínico-laboratorial da doença com o tratamento dos casos humanos, (ii) a borrifação de inseticidas nas áreas de circulação do vetor e (iii) a identificação e eliminação dos cães infectados (MS, 2006).

Em paralelo, estudos que demonstraram uma conduta preventiva da LV entre os profissionais de saúde e a população tornaram evidentes que a promoção da educação em saúde permite um melhor comportamento das pessoas e ações no controle da doença (CARVALHO *et al.*, 2013; KHANI JEIHOONI *et al.*, 2012). Somado a isso, faz-se necessário o investimento em pesquisas, visto que a LV é potencialmente fatal se não tratada, pois causa disseminação e infiltração do parasito para o fígado, baço e medula óssea de pacientes. Em adição, a ausência de uma vacina efetiva, bem como de um diagnóstico sensível e específico que possibilite a detecção precoce dos casos e, a ocorrência de toxicidade dos medicamentos utilizados no tratamento tornam essa doença mais ameaçadora para os pacientes acometidos (SHARMA *et al.*, 2017; SUNDAR; RAI, 2002).

Uma vez que o controle celular da infecção por *Leishmania* é mediado por uma resposta imune do tipo Th1, baseada na produção de IFN- $\gamma$  (GOTO; LINDOSO, 2004), o desenvolvimento de vacinas contra a doença tem focado na identificação e no uso de antígenos recombinantes capazes de suscitar respostas celulares protetoras. Sabe-se que indivíduos que curam da doença desenvolvem imunidade duradoura contra a infecção por espécies do complexo *L. donovani* (AGALLOU *et al.*, 2012). Em

modelos murinos, após a cura da leishmaniose cutânea (LC) causada pela espécie *Leishmania major*, os animais adquirem imunidade duradoura contra a reinfeção pelo parasito (SCOTT *et al.*, 1987).

Células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são essenciais na proteção contra a infecção por *Leishmania* (GOTO; LINDOSO, 2004). Tais células produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, entre outras e, estimulam as células efetoras de longa duração. Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e IL-13 podem suprimir a resposta Th1, permitindo o desenvolvimento da doença (GANNAVARAM *et al.*, 2016).

Como mecanismo de avaliação da imunogenicidade de moléculas através de ensaios *in vitro*, as *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) vêm sendo empregadas nos estudos imunológicos da LV humana, sendo que quando obtidas de pacientes com a doença subclínica ou assintomática, as mesmas respondem à estimulação com proteínas do parasito apresentando proliferação e produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-12. Inversamente, PBMCs isoladas de pacientes com LV ativa não geram resposta a esses antígenos (AGALLOU *et al.*, 2012; WHITE *et al.*, 1992), ou produzem níveis elevados de IL-10, além do aumento significativo na expressão de RNAm de IL-10 em tecido lecionado desses pacientes, como baço, linfonodos e medula óssea (ANSARI *et al.*, 2011).

Muitos trabalhos vêm sendo realizados utilizando antígenos expressos sob a forma de proteínas recombinantes, vacinas de DNA, peptídeos sintéticos e/ou proteínas quiméricas. Tais estudos apresentam resultados nos quais essas moléculas preenchem, parcialmente, requisitos para serem empregados como candidatos à vacina contra a LV, porém devido à dificuldade de induzir uma imunidade celular duradoura, especialmente, contra a LV, com elevada estabilidade e baixo custo de produção, ainda não há uma vacina disponível e que possa ser considerada eficaz no combate à doença (COELHO *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2017; GIUNCHETTI *et al.*, 2007; JAIN JAIN, 2015; LAGE *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2015).

Com o avanço das pesquisas no campo da biotecnologia, novas ferramentas se encontram disponíveis para a seleção e identificação de novos antígenos, tais como a técnica de *Phage Display*. Essa é uma abordagem molecular de identificação e caracterização de novos antígenos, sendo conhecidos como mimotopos (SMITH, G., 1985). Tais moléculas têm sido utilizadas em diferentes aplicações biotecnológicas

contra doenças, tais como alvos vacinais (AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2014; PRUDENCIO *et al.*, 2009), marcadores diagnósticos (COSTA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016) e alvos imunoterapêuticos (ADHYA; MERRIL; BISWAS, 2014), sendo que o impacto biológico e comercial dessa tecnologia vem sendo considerado incalculável nas últimas décadas (SALMOND; FINERAN, 2015).

No presente estudo, a tecnologia de *Phage Display* foi utilizada para buscar novos clones de fagos que expressam mimotopos específicos de anticorpos IgG purificados de pacientes com LV, mas que não foram reconhecidos por anticorpos purificados de indivíduos não infectados. Após os ciclos de *biopanning*, os mimotopos selecionados foram utilizados para estimular PBMCs de indivíduos não infectados e que vivem em uma área endêmica da doença e de pacientes com LV assintomática e sintomática, com o objetivo de isolar aqueles capazes de induzir maiores níveis de IFN- $\gamma$  e menor produção de IL-10. Os clones então selecionados com maior razão entre IFN- $\gamma$ /IL-10 foram utilizados para imunizar camundongos BALB/c, que, posteriormente, foram infectados com *L. infantum*.

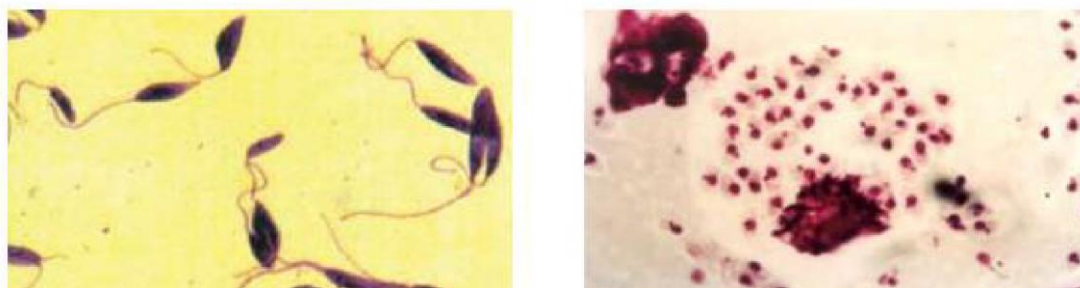
A estratégia de seleção apresentou resultados promissores, sendo uma prova de conceito para a descoberta de novos imunógenos capazes de induzir ao desenvolvimento de uma resposta celular Th1 e proteção contra a LV.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Etiologia e o ciclo biológico

As leishmanioses compõem um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que se caracterizam por apresentarem três formas clínicas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV). A LV é causada por espécies do complexo *Leishmania donovani*, que inclui as espécies *L. donovani* e *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*).

O ciclo biológico do parasito *Leishmania* apresenta duas formas morfológicas principais: a amastigota, forma aflagelada, intracelular e que se multiplica nos macrófagos de mamíferos, e a promastigota, forma extracelular, flagelada e se replica no intestino médio do vetor (**Figura 1**) (FATAHALIHA et al., 2015; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012).

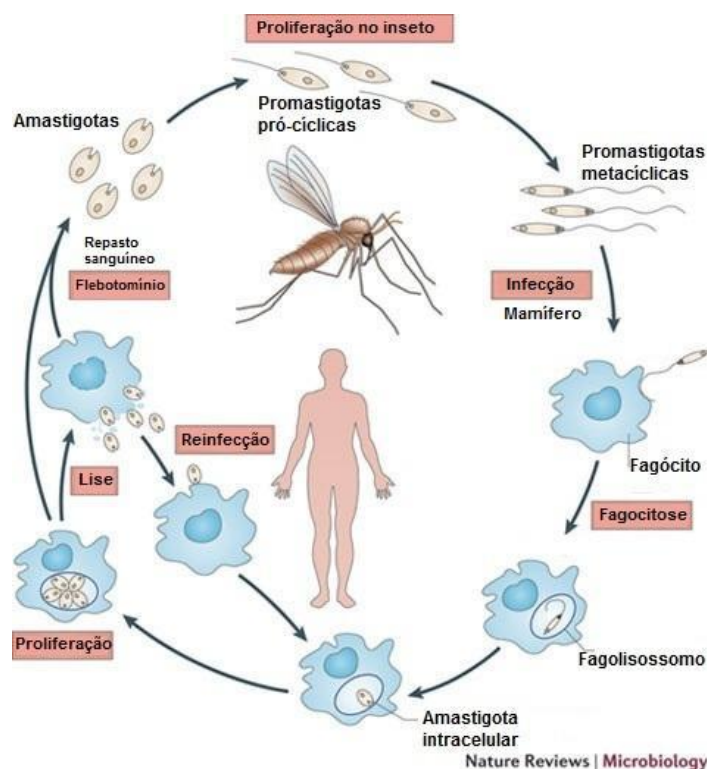


**Figura 1.** Formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita) do protozoário *Leishmania*.  
Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil (MS, 2006).

As leishmanioses são classificadas, primariamente, como uma zoonose, mas quando o homem entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, este pode ser acometido, sendo então, consideradas como antroponozoonoses. A transmissão ocorre por vetores flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Américas) Os insetos são pequenos e medem de 1 a 3 mm de comprimento. Possuem o corpo revestido por pelos e coloração clara (castanho claro ou cor de palha). Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e as fêmeas se alimentam também de sangue para o desenvolvimento dos ovos. Na fase larvária, desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Na fase adulta são adaptados a diversos ambientes,

sendo relatada cada vez mais sua adaptação ao ambiente urbano (MS, 2006; SUNDAR; RAI, 2002)

As leishmanioses têm os mamíferos como reservatórios, sendo no ambiente silvestre, os marsupiais e as raposas; e na área urbana, o cão como a principal fonte de manutenção do parasito (MS, 2006).

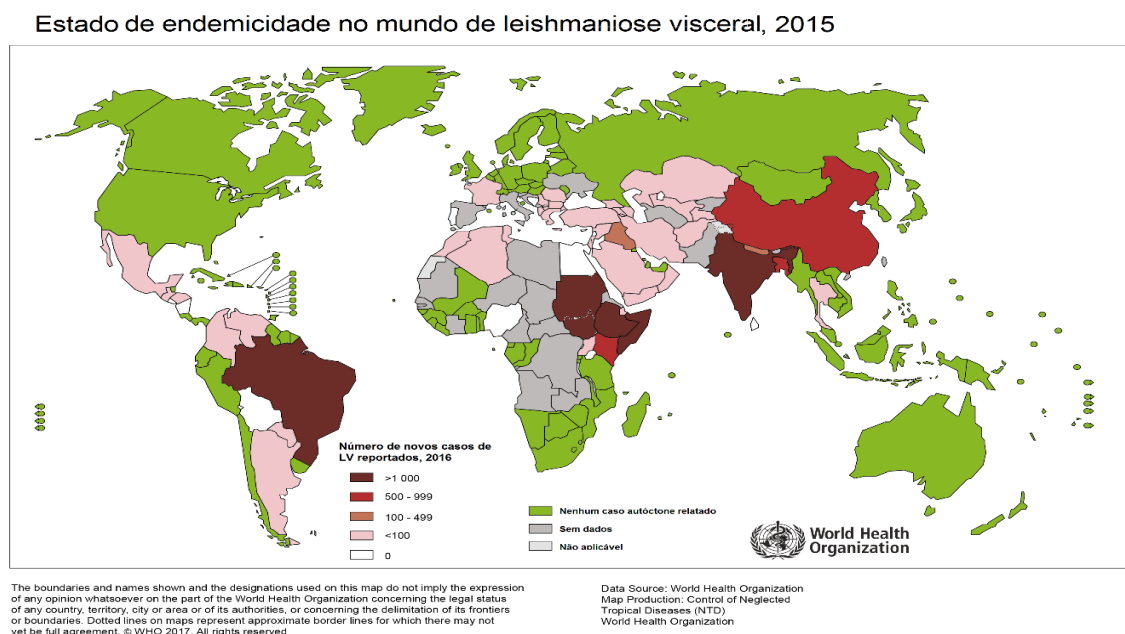


**Figura 2.** Ciclo de biológico do parasito *Leishmania*.  
Fonte: Adaptado (KAYE, PAUL; SCOTT, 2011).

No ciclo biológico do parasito (**Figura 2**), na porção anterior do intestino médio do vetor flebotomíneo, as formas promastigotas procíclica se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas infecciosas. Durante o repasto sanguíneo, o inseto regurgita promastigotas metacíclicas juntamente com componentes salivares, sendo tais formas então fagocitadas por células mononucleares presentes no local, principalmente, por macrófagos. Após serem internalizadas nas células, o parasito assume a forma amastigota aflagelada, que passa por replicação dentro das células hospedeiras. Tais células podem então se romper e os parasitos livres podem ser tomados por novos fagócitos locais. O ciclo da transmissão é completado quando os fagócitos infectados com as formas amastigotas são absorvidos por outro flebotomíneo, e em seguida, convertidos em promastigotas no intestino médio dos mesmos (KAYE, PAUL; SCOTT, 2011).

## 2.2. Epidemiologia

As leishmanioses são classificadas como uma doença tropical negligenciada e endêmica em 98 países e em três continentes do mundo, com mais de 350 milhões de pessoas expostas aos riscos de infecção. Anualmente, cerca de 1,3 milhões de casos da doença são registrados, sendo 300.000 de LV, com 20.000 a 40.000 óbitos registrados (ALVAR *et al.*, 2012; OMS, 2016). Quatro países: Brasil, Índia, Sudão do Sul e Sudão, relataram mais de 2.000 novos casos de LV, representando 73% dos casos globalmente; somando-se à Etiópia, Quênia e Somália, sendo todos esses países representando 90% dos casos de LV relatados no mundo (**Figura 3**) (OMS, 2013, 2017).

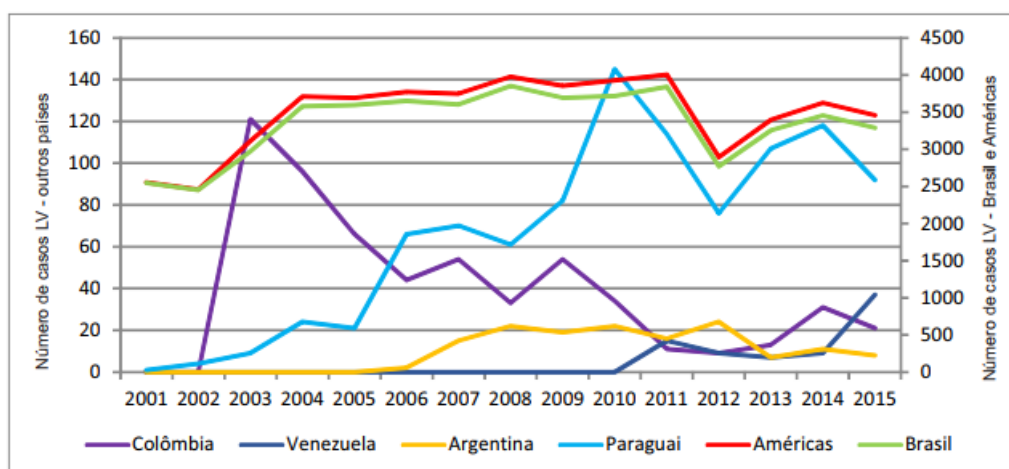


**Figura 3.** Incidência de leishmaniose visceral no mundo em 2015.  
Fonte: Adaptado de Organização Mundial de Saúde (OMS, 2016).

Dados relatados pelo Informe Epidemiológico das Américas (OPAS\_OMS, 2017), os casos humanos de LV estão presentes em 12 países das Américas, porém o Brasil é responsável por 96% dos casos relatados. No período de 2001 a 2015 foram reportados 52.176 casos humanos de LV nas Américas. Observa-se entre 2004 e 2011 uma tendência estável no número de casos, com média anual de 3.835 registros, com redução dos casos em 2012, para 2.892. Todavia, a partir de 2013, houve novamente, o aumento da incidência (3.492) como demonstrado na **Figura 4**. Nas Américas, foi reportado, em 2015, um total de 3.456 casos de LV e taxa de incidência



de 2,27 casos para cada 100.000 habitantes, sendo o Brasil responsável por 95,1% das ocorrências (OPAS\_OMS, 2017).

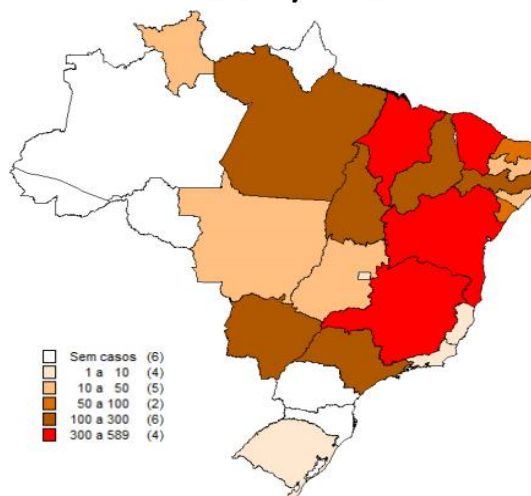


**Figura 4.** Casos de leishmaniose visceral, segundo países das Américas com maior ocorrência de casos, 2001-2015.

Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais/Serviços de vigilância.

No Brasil, a LV apresentava anteriormente caráter predominantemente rural e, mais recentemente, vem-se expandindo para as áreas urbanas de cidades de médio e grande porte (MS, 2006). Atualmente, a LV atinge as cinco regiões brasileiras, encontrando-se em 21 unidades federadas, e vem se expandindo para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, não sendo mais o Nordeste responsável por 90% dos casos, mas por 53,6% (**figura 5**) como relatado no Manual do Ministério da Saúde do Brasil (MS, 2015).

### Casos de LV por UF de infecção, Brasil, 2015



**Figura 5.** Casos de leishmaniose visceral registrados no Brasil por Unidade Federativa, 2015.

Fonte: SVS\_MS 2015.

### 2.3. Manifestações Clínicas da Leishmaniose Visceral

A LV pode apresentar manifestações clínicas variáveis, sendo a grande maioria dos indivíduos infectados, mas assintomáticos, pelo resto da vida. Em regiões endêmicas, estima-se que 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma clássica e aguda da doença. Fatores como idade, estado nutricional e características imunogenéticas do indivíduo acometido estão intimamente ligadas ao desenvolvimento dos sintomas e sua gravidade (GONTIJO; MELO, 2004; MS, 2015).

Parasitas das espécies *L. donovani* ou *L. infantum* infectam o baço, fígado, a mucosa do intestino delgado, medula óssea, os linfonodos e outros tecidos linfoides, podendo causar hiperplasia reticuloendotelial. A vida útil dos leucócitos e eritrócitos é reduzida, causando granulocitopenia e anemia. A função hepática pode ser normal ou alterada; a produção de protrombina diminui, juntamente com a trombocitopenia, que podem resultar em hemorragia mucosa grave. A hipoalbuminemia está associada com edema e outras características da desnutrição. A diarreia pode ocorrer como resultado de parasitismo intestinal causando ulceração ou enterite secundária (GILLESPIE *et al.*, 2016; OMS, 2010). Em estágios mais avançados, como a forma crônica ou no Kala-azar clássico de evolução prolongada, o paciente pode apresentar febre irregular, emagrecimento progressivo, edema generalizado, dispneia, cefaleia, dores musculares e infecções intercorrentes, como pneumonia, disenteria e tuberculose, sendo causas comuns de morte (CHAPPUIS *et al.*, 2007; OMS, 2010).

Em relação aos cães, a doença possui aspecto sistêmico e crônico, porém, a evolução aguda pode levar o animal ao óbito em poucas semanas (GONTIJO; MELO, 2004). Os animais infectados são classificados de acordo com os sinais clínicos apresentados: assintomáticos, com ausência de sinais clínicos sugestivos; oligossintomáticos, com poucos sintomas aparentes e, sintomáticos, com vários sintomas da doença (MANCIANTI *et al.*, 1988).

Considerando a população de animais soropositivos, 40 a 60% são assintomáticos, configurando-se como principais reservatórios das espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*. A outra parcela de animais que desenvolvem a doença, após um período de incubação de 2 a 4 meses, são cães com doença progressiva e que podem apresentar linfadenopatia (93%), dermatite (90%), perda de peso (26%), caquexia (24%), problemas de locomoção (23%), conjuntivite (18%) e epistaxe (9%), com elevada resposta de anticorpos policlonal (MORENO;

ALVAR, 2002). Assim, a LV canina (LVC) não representa apenas um problema veterinário, já que há uma correlação direta com a incidência dos casos humanos (MIRÓ *et al.*, 2011).

## 2.4. Medidas de controle

As leishmanioses têm sido observadas em grandes centros urbanos, mostrando uma diversidade e adaptação do parasito e de seu vetor às mudanças ambientais causadas pelo homem. Tais fatores permitiram a existência de várias manifestações clínico-epidemiológicas da doença e dificultam as medidas de controle nessas áreas (SOUZA *et al.*, 2004).

Devido à magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica, em 2011, a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) instituiu o Programa Regional de Leishmanioses (PRL), que realiza cooperações técnicas, missões, consultorias e capacitações para fortalecer as ações de vigilância, prevenção e controle das leishmanioses nas Américas, com o propósito de apoiar os países membros nos compromissos assumidos na Assembleia Mundial da Saúde e Conselho Diretivo da OPAS/OMS (OPAS\_OMS, 2013). Já em 2016, os Estados Membros da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) aprovaram o Plano de Ação para eliminação das doenças negligenciadas e medidas posteriores à eliminação (2016-2022), em que foram definidos objetivos específicos para o fortalecimento da vigilância e do controle da doença nas Américas. Posteriormente, foi elaborado o Plano de Ação de Leishmanioses das Américas (2017-2022) detalhando as metas, indicadores e linhas de ações para reduzir a morbidade e mortalidade causadas pela doença na região (OPAS\_OMS, 2017).

Os métodos de diagnóstico utilizados para na LV apresentam vantagens e limitações. O padrão-ouro envolve o isolamento e a identificação de parasitos por meio de microscopia ou cultura *in vitro* e evidencia uma infecção em curso. Tal método possui alta especificidade, mas é invasivo e sua sensibilidade é variável, devido à qualidade da amostra colhida e a capacitação do técnico envolvido (BOGGILD *et al.*, 2010; CHAPPUIS *et al.*, 2007; SUNDAR; RAI, 2002). Técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), detectam a presença de material genético de *Leishmania*, mas também requerem amostragem a partir de órgãos infectados, e sua eficácia é limitada pela persistência de material genético do parasito mesmo após

a cura clínica do paciente (BOGGILD *et al.*, 2010). Já os testes sorológicos, como o teste de aglutinação direta e o teste imunocromatográfico detectam anticorpos anti-*Leishmania* no soro de pacientes com LV, porém, indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas ou indivíduos curados podem apresentar soropositividade (SALLES *et al.*, 2017; SRIVIDYA *et al.*, 2012). Também, há variações de especificidade devido aos diferentes antígenos utilizados (LIMA *et al.*, 2017).

Paralelamente, o tratamento da LV é complicado devido à toxicidade dos fármacos usados, podendo gerar mialgia, artralgia, anorexia, febre e urticária, além de toxicidade no fígado, rins e baço dos pacientes. O alto custo e longos regimes terapêuticos são também fatores que agregam complexidade ao combate da doença (CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL *et al.*, 2015; MS, 2015).

Quanto ao tratamento de cães, o mesmo não é recomendado, uma vez que não diminui a transmissibilidade do animal ao inseto vetor (MIRÓ *et al.*, 2011). A utilização do medicamento miltefosina em animais teve seu registro deferido em 2016 pelo MAPA, tornando-se legalizado, porém, é uma escolha exclusiva do proprietário do animal, não sendo configurada como uma medida de Saúde Pública para o controle da doença, visto que não há evidências científicas, até o momento, que comprovem eficácia para ser incorporada no protocolo terapêutico da LV (MS, 2016).

Somado a essas medidas, também é preconizado pelo Ministério da Saúde o combate ao vetor visando a contenção da transmissão da infecção, com o uso de inseticidas residuais e medidas sanitárias direcionadas às áreas de circulação do flebotomíneo, além da utilização de coleiras impregnadas com estas substâncias em animais domésticos, diminuindo significativamente o contato direto do vetor com o cão (LUZ *et al.*, 2010; SEVÁ *et al.*, 2016).

Além desses fatores que influenciam na prevalência e incidência da doença, a ocorrência de várias espécies de *Leishmania*, o contínuo aumento das infecções causadas por esses parasitos e as diferentes situações epidemiológicas encontradas, além da maior urbanização, são elementos que demandam a adoção de diferentes estratégias para o controle dessa endemia no Brasil, bem como de estudos relacionados aos parasitos, controle dos vetores, fontes de infecção, aspectos clínicos, distribuição geográfica, fatores históricos e socioeconômicos, integração dos serviços de saúde, tecnologias apropriadas de diagnóstico, tratamento e imunoprofilaxia da doença (GONTIJO; MELO, 2004; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Somando-se a isso, a realização de trabalhos com a população, envolvendo educação, promoção da saúde e a participação das comunidades no planejamento, desenvolvimento e manutenção dos programas adotados no Brasil, demonstra impulso para um controle mais efetivo do número de casos da doença (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; SOUZA *et al.*, 2004).

## 2.5. Imunologia na Leishmaniose Visceral

Em camundongos, é possível visualizar respostas imunitárias compartimentadas, diferentemente de humanos, nos quais a infecção é progressiva e com diferentes graus de carga parasitária nos órgãos internos. Porém, essa característica pode ser uma vantagem no sentido de se conhecer as redes imunológicas determinantes na eliminação e/ou persistência do parasito durante a infecção por *L. infantum* (RODRIGUES *et al.*, 2016). Além disso, como estudo primário e devido às inúmeras vantagens desse modelo, como o genoma murino ser o segundo mais estudado entre os mamíferos, camundongos BALB/c se tornam aplicáveis nos estudos de avaliação de vacinas e terapias contra o parasito (RAMÍREZ *et al.*, 2013); além do fácil manuseio, baixo custo, tempo de experimentação e disponibilidade de reagentes para caracterizar a resposta imune frente à *Leishmania* spp. (GARG; DUBE, 2006).

É estabelecido, em modelos murinos, que a resistência à LC está associada ao desenvolvimento da resposta Th1, caracterizada alta produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , enquanto a resposta Th2, característica de susceptibilidade à doença, tem produção de citocinas como IL-4 e IL-10 (OGHUMU *et al.*, 2010). Estudos analisando a infecção desses animais por *L. donovani* mostraram que o controle da infecção pelo parasito está associado à migração de células T e de células dendríticas para o local do parasitismo crônico, com a produção de IFN- $\gamma$  e IL-12, enquanto que no início da infecção há maior produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , além de menor quantidade de células T e maior número de macrófagos infectados (MELBY *et al.*, 2001). De fato, nos seres humanos, a gravidade da LV tem sido associada ao aumento dos níveis de IL-10, mesmo não ocorrendo claramente a dicotomia Th1/Th2 (RODRIGUES *et al.*, 2016).

O destino das formas amastigotas intracelulares pode variar de acordo com o tipo de resposta imune, sendo influenciada por diversos elementos, como citocinas e quimiocinas (KANE; MOSSER, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2006). As células dendríticas, do inglês dendritic cells (DCs), após serem expostas ao parasito ou seus antígenos,

ou ainda, com a fagocitose de macrófagos contendo parasitos intracelulares se direcionam para tecidos linfoides, como linfonodo e baço (STANLEY; ENGWERDA, 2007), gerando a apresentação de antígenos para células T. Por secreção de citocinas, como IL-12 ou IL-23, orientam, respectivamente, a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> para os tipos Th1 e Th17, nas quais se observa a produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17. Essas citocinas maximizam a capacidade dos macrófagos infectados de produzirem óxido nítrico, do inglês Nitric Oxide (NO) e, espécies reativas de oxigênio, do inglês reactive oxygen species (ROS), para combaterem os parasitos intracelulares. Paralelamente, células T CD8<sup>+</sup> são estimuladas por DCs e, na presença de IFN- $\gamma$  e IL-12, apresentam elevada expansão clonal e se diferenciam em células T efetoras (KAYE, PAUL M. et al., 2004), que contribuem para a resposta protetora pela produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Células T CD8<sup>+</sup> efetoras podem também secretar perforinas e granzimas e eliminarem as células infectadas (RODRIGUES *et al.*, 2016; WANASEN *et al.*, 2007).

Em contraste, a doença pode progredir devido à multiplicidade de fatores, incluindo a ação de citocinas supressoras, exaustão de células T específicas, perda de arquitetura de tecido linfóide e resposta humoral aumentada (OGHUMU et al., 2010). As CDs infectadas perdem sua capacidade de iniciar respostas protetoras (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2015), gerando produção de citocinas tais como IL-12, IL-27 e IL-10, que levam à diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em T reguladoras (Tr1) e que produzem, simultaneamente, IFN- $\gamma$  e IL-10, diminuindo a ação leishmanicida do macrófago. Além disso, ocorre exaustão das células T CD8<sup>+</sup> específicas (JOSHI, TRUPTI *et al.*, 2009), com a expressão de receptores inibitórios, diminuição de sua atividade efetora e, conseqüentemente, menor capacidade em combater o parasito, gerando possível persistência do parasito no organismo (RODRIGUES *et al.*, 2016; WANASEN *et al.*, 2007).

A ativação de respostas oxidativas, pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, é um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares (WANASEN *et al.*, 2007), porém estudos demonstraram que promastigotas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de humanos e cães, são resistentes em casos de recidiva da doença (DE MOURA *et al.*, 2016) ou naturalmente resistentes; sendo esse perfil capaz de aumentar sua capacidade infecciosa em macrófagos murinos (SANTOS *et al.*, 2012).

Em um estudo publicado (HOLZMULLER *et al.*, 2006), observou-se a influência de *nitric oxide* (NO) em culturas de promastigota e amastigota de *Leishmania*. A mobilidade de promastigotas foi prejudicada e a viabilidade do parasito diminuiu gradualmente em função do tempo, concluindo que a produção do NO levou à inibição metabólica letal em ambos os estágios de desenvolvimento do parasito, pelo menos em parte, desencadeando a perda de ferro dos grupos prostéticos (ferro-enxofre) de enzimas (HOLZMULLER *et al.*, 2006) presentes em vias enzimáticas vitais para a sobrevivência de amastigotas dentro dos macrófagos (GREEN, S J *et al.*, 1990).

Em relação à resposta humoral, sabe-se que a hipergamaglobulinemia é um fator associado com a progressão da LV, correlacionando-se com a gravidade da doença. Porém, a maioria das imunoglobulinas G (IgG) são inespecíficas, sendo resultado da ativação policlonal de células B (RODRIGUES *et al.*, 2016). É também relatado em estudos que a formação de complexos imunes de IgG nas leishmanioses pode contribuir para a progressão da doença, a partir da opsonização do parasito pelos anticorpos e indução de macrófagos ativados a produzirem IL-10, ao invés de IL-12 (KANE; MOSSER, 2001; MILES *et al.*, 2005; SUTTERWALA *et al.*, 1997). Todavia, alguns pesquisadores demonstraram uma associação direta entre IgG1 e o desenvolvimento sintomático da doença, enquanto que a produção do isotipo IgG2a foi associada com quadros assintomáticos (MENDES *et al.*, 2003). Com isso, estudos utilizam da avaliação das subclasses de IgG como subsídio indireto para avaliação do tipo de resposta que está sendo desenvolvida, sendo a IgG1 característica de resposta Th2 e a IgG2a e IgG3, da resposta Th1 (COSTA *et al.*, 2014; DIAS *et al.*, 2017; LAGE *et al.*, 2016; MAROOF *et al.*, 2012).

A carga parasitária hepática murina sofre depuração cerca de duas semanas após a infecção, a partir da interação das células dendríticas e macrófagos infectados com os parasitos, com as células T e, conseqüente formação de granulomas. Em contraste com o que ocorre no fígado, o baço e a medula óssea apresentam persistência dos parasitos, resultando em infecção crônica e sistêmica. A ausência de reação granulomatosa no baço e a produção reduzida de IL-12 pelos macrófagos locais direcionam para um aumento da carga parasitária neste órgão (RODRIGUES *et al.*, 2016).

## 2.6. Desenvolvimento de vacinas

O desenvolvimento de uma vacina poderia representar um dos meios mais econômicos para o controle das leishmanioses. De acordo com estudos publicados com a LC, estima-se que uma vacina com 70% de eficácia e que ofereça proteção durante 10 anos poderia prevenir cerca de 40 a 140 mil casos da doença em países como Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, México, Peru e Venezuela, apresentando menor custo em relação aos tratamentos atuais. Para a LV, mesmo uma vacina que forneça proteção por apenas cinco anos e com 50% de eficácia, o custo seria mais menor em relação ao tratamento atual (GILLESPIE *et al.*, 2016). Em outras palavras, uma vacina segura, acessível e eficiente e que confere imunidade duradoura pode representar a maneira mais econômica de controle da LV (SANTOS-GOMES *et al.*, 2014).

Todavia, limitações sugerem justificativas para a ausência de uma vacina anti-*Leishmania* bem sucedida, como investimentos escassos de empresas para as doenças negligenciadas, as preocupações com a manutenção da imunidade protetora das vacinas e reações secundárias por elas causadas, o uso e as adequações de adjuvantes, como estabilidade, segurança e imunogenicidade; a diversidade de espécies e a virulência de cada parasito, além da variabilidade intrínseca de cada receptor da vacina (SRIVASTAVA *et al.*, 2016).

Paralelamente, argumentos que sustentem a viabilidade de uma vacina contra as leishmanioses incluem a imunidade adquirida por pessoas que se recuperam da doença (AGALLOU *et al.*, 2012) e a prática antiga de leishmanização, que consistia em uma prática realizada no Oriente Médio e na Ásia Central, em que indivíduos eram infectados pela introdução de baixo número de parasitos vivos, a fim de se simular uma infecção cutânea em local não exposto no corpo, prevenindo o risco de lesões maiores a partir de uma infecção natural (COSTA *et al.*, 2011; GILLESPIE *et al.*, 2016; OMS, 2010).

Não existe ainda, uma vacina licenciada contra a leishmaniose humana e, embora várias vacinas tenham avançado para testes clínicos, a maioria está em pesquisa em modelos animais, como camundongos e hamsters. Tais estudos são ora relevantes, pois fornecem informações quanto à imunidade celular e têm facilitado trabalhos *in vivo* sobre o mecanismo de ação de candidatos vacinais e adjuvantes, porém, a



extrapolação para organismos mais complexos, como cães e humanos, torna-se uma tarefa difícil (COSTA *et al.*, 2011; GILLESPIE *et al.*, 2016).

A pesquisa e utilização das tecnologias disponíveis para o desenvolvimento de uma vacina contra as leishmanioses permeiam desde a utilização dos parasitos vivos atenuados ou geneticamente modificados, parasitos mortos, frações de *Leishmania* ou proteínas recombinantes e vacinas de DNA ou gênicas (NAGILL; KAUR, 2011; SRIVASTAVA *et al.*, 2016).

Vacinas de primeira geração são as que utilizam parasitos atenuados ou mortos por diversos mecanismos, como culturas *in vitro* e por longo prazo, submissão a temperaturas críticas, mutagênese química, irradiação ou autoclavação (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008). Tais vacinas têm como principal barreira a ausência de biomarcadores associados com proteção e segurança, além de temores de que o parasito volte à forma virulenta, particularmente, em indivíduos imunossuprimidos (SRIVASTAVA *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de vacinas de segunda geração requerem preparações mais refinadas do que as anteriores, sendo elaboradas a partir de proteínas recombinantes e/ou purificadas de *Leishmania* (DUARTE *et al.*, 2016; JAIN; JAIN, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Como exemplos desse grupo, temos a Leishmune<sup>®</sup>, uma vacina veterinária produzida a partir de uma fração glicoproteica purificada de *Leishmania donovani*, associada ao adjuvante saponina e utilizada contra a LVC (JAIN; JAIN, 2015). Essa vacina foi recentemente suspensa pelo MAPA devido à ausência de comprovação dos requisitos de ensaio clínico de Fase III (MAPA, 2008). Já a vacina Leish-Tec<sup>®</sup>, atualmente disponível no mercado contra a LVC, é produzida a partir da proteína recombinante A2 de *Leishmania infantum* associada também ao adjuvante saponina e, possui 71% de eficácia em estudos de fase III (FERNANDES *et al.*, 2008).

Outra vacina de segunda geração para LVC, a CaniLeish<sup>®</sup> (Virbac, França), é produzida a partir de antígenos da *Leishmania infantum* (LiESP/QA-21) e foi lançada em 2011, sendo comercializada em alguns países da Europa, porém, não disponível no Brasil. Foi comprovado que ela induz uma resposta imune do tipo Th1, com a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos após a estimulação *in vitro*, além do aumento da atividade leishmanicida de macrófagos de cães vacinados (MORENO *et al.*, 2012). Entretanto, a vacina tem, inicialmente, um caráter terapêutico, ou seja, não previne o

ção da infecção primária pelo protozoário, apenas diminui o risco da progressão da doença e controla a carga parasitária no animal vacinado (MARTIN *et al.*, 2014).

As vacinas de terceira geração são baseadas em DNA, sendo consideradas como inovadoras e com alto potencial de revolucionar o tratamento e a prevenção das doenças infecciosas. O desafio para essa tecnologia é a otimização das vacinas de DNA para que as mesmas induzam forte resposta celular e humoral no homem, porém, sem o risco de que o aumento da imunogenicidade possa promover ou exacerbar uma resposta pró-inflamatória (GURUNATHAN *et al.*, 2000). Tais vacinas são mais estáveis e têm a vantagem de baixo custo de produção, além de não requererem o uso de adjuvantes, mas como nenhuma vacina humana baseada em DNA foi licenciada, permanece o interesse em se buscar inovações dentre as outras gerações de vacinas (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008).

Dessa forma, sistemas de entrega de antígenos vacinais tem ganhado atenção, tais como lipossomas, micropartículas, e microrganismos portadores, como bactérias (DAMO XU *et al.*, 1990) e vírus, que possuem capacidade de serem absorvidos por células dendríticas, além de expressar genes exógenos (HANDMAN, 2001; SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Uma tecnologia disponível e que vem sendo estudada é o *Phage Display*, que utiliza de bacteriófagos como veículos de entrega, com as vantagens de não interferirem na resposta imune contra os antígenos peptídicos exibidos e poderem direcionar de forma mais eficiente a expressão de antígenos para as células apresentadoras de antígenos (CUI *et al.*, 2013).

## 2.7. Técnica de Phage Display

A técnica de *Phage Display* vem sendo usada como uma inovação biotecnológica, apresentando inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de novos dispositivos para diagnóstico, tratamento e vacinas contra doenças (ADHYA; MERRIL; BISWAS, 2014; SALMOND; FINERAN, 2015; SZALAI; JENSEN-JAROLIM, 2008). O *Phage Display* se baseia na utilização de bacteriófagos geneticamente modificados, que expressam em seu capsídeo viral um peptídeo aleatório, sendo chamados de “mimotopos”, pois são sequências que imitam epitopos de forma estrutural e/ou imunológica (SZALAI; JENSEN-JAROLIM, 2008).

Os bacteriófagos são parasitos intracelulares obrigatórios de bactérias e, foram descobertos em 1915 pelo patologista britânico Frederick Twort, e em 1917, por Félix

d'Hérelle, um microbiologista franco-canadense, sendo este que concebeu o termo "bacteriófago", que significa "comedor de bactéria", a partir do isolamento de um microrganismo de *Shigella* (D'HERELLE, 2007; SALMOND; FINERAN, 2015). Posteriormente, em 1985, Smith propôs a técnica de *Phage Display*, que consiste em uma tecnologia baseada na expressão de peptídeos, proteínas ou fragmentos de anticorpos associados a proteínas presentes na superfície externa dos bacteriófagos e, uma vez que a sequência de nucleotídeos codificadora do inserto é geneticamente fundida à sequência codificadora das proteínas dos fagos, forma-se uma proteína híbrida exposta na superfície externa da partícula viral, sem prejudicar a infectividade do parasito (BARBAS *et al.*, 2001; SMITH, G., 1985).

Existem diversas classes de fagos, por suas características estruturais e ciclo de reprodução, tais como os fagos filamentosos (Ff), de cauda T7, fago lambda ( $\lambda$ ) ou T4; sendo que os mesmos têm sido amplamente utilizados como vetores de clonagem devido à sua simplicidade no genoma e em sua estrutura (TAN *et al.*, 2016). Todavia, cada tipo de fago apresenta vantagens e desvantagens que geram a escolha ideal de acordo com os procedimentos técnicos adotados e os objetivos da pesquisa (DANNER; BELASCO, 2001; RODI; MAKOWSKI, 1999; WILLATS, 2002).

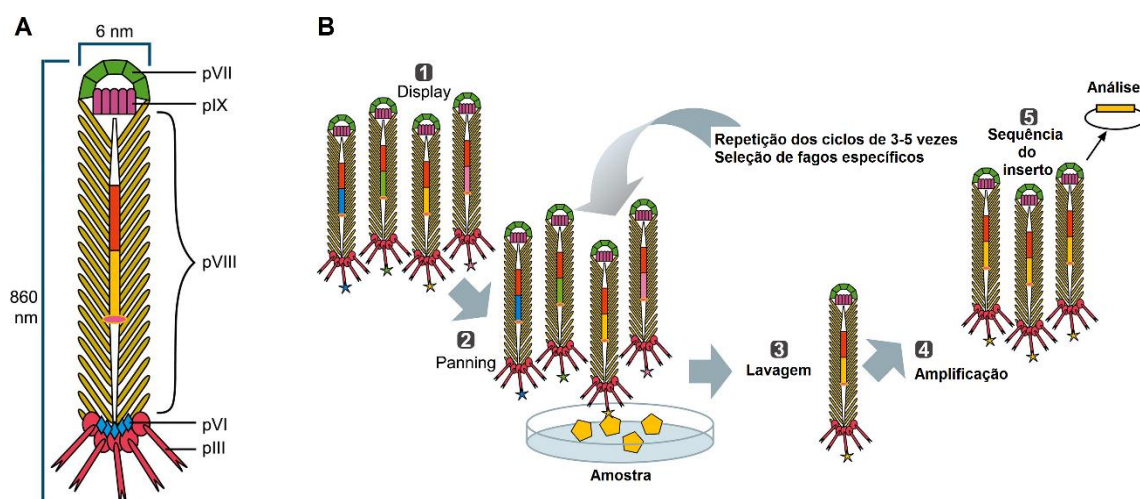
Fagos filamentosos da classe Ff, como os dos tipos M13, fd e f1, utilizados neste projeto, apresentam vantagens experimentais, tais como o ciclo lisogênico de replicação, em que não há necessidade de romper a célula bacteriana hospedeira para finalizarem seu ciclo, em outras palavras, os fagos são secretados da célula hospedeira sem sua lise, diminuindo consideravelmente a presença de endotoxinas bacterianas na amostra final (WILLATS, 2002).

O fago filamentoso da classe M13 [**Figura 6(A)**] possui cerca de 900 nm de comprimento, 6 nm de largura e transporta um DNA de cadeia simples (ss), além de cinco proteínas de revestimento (PVIII, PIX, PVII, PVI, PIII) (WILSON; FINLAY, 1998). O DNAss tem 6.407 nucleotídeos que codificam cerca de 2.700 a 3.000 cópias da proteína de revestimento principal (PVIII) no comprimento e cinco cópias de cada uma das quatro proteínas diferentes de revestimento secundárias (PIX, PVII, PVI, PIII) nas extremidades (SPECTHRIE *et al.*, 1992).

Os fagos são capazes de infectar bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli*, porém, infectam apenas as células bacterianas que portam o plasmídeo fimbrial F, o fator de fertilidade bacteriano, de modo que sua produção pode ser controlada,

não havendo possibilidade dos mesmos desencadearem um processo infeccioso em outras estruturas celulares, como as do homem ou outros mamíferos. Também, considerando que o plasmídeo F é despolimerizado após a infecção, cada bactéria só pode ser infectada por um fago (SCHMITZ *et al.*, 2000). Tal fato é importante, pois no momento da amplificação e do isolamento dos fagos selecionados, cada clone bacteriano representa um fago específico que codifica um peptídeo ou anticorpo exclusivo (EBRAHIMIZADEH; RAJABIBAZL, 2014).

A seleção de bacteriófagos recombinantes contendo mimotopos específicos para um certo alvo pode ser feita a partir de uma biblioteca heterogênea contendo inúmeras partículas virais geneticamente modificadas (SMITH, G., 1985). A triagem de moléculas de alta afinidade em relação a um determinado receptor-alvo, aderido a uma superfície sólida, é realizada por etapas consecutivas de seleção denominadas de ciclo de *biopanning*, ou bio-seleção, como demonstrado na **figura 6(B)** (PARMLEY; SMITH, 1988).



**Figura 6.** Estrutura do fago filamentosso M13 (A). Ciclo de Biopanning (B).

Descrição do ciclo: (1) Biblioteca de bacteriófagos geneticamente modificados. (2) *Panning*: A biblioteca de fagos que exibe peptídeos ou proteínas distintas (estrelas com cores diferentes) é exposta à amostra-alvo aderida na placa (pentágono amarelo); o fago com o mimotopo é capturado (fago com estrela amarela). (3) Lavagem e enriquecimento: Os fagos não ligados são lavados e o fago capturado é eluído. (4) Amplificação: o fago eluído é então amplificado por infecção de uma *E. coli* adequada. (5) O inserto do fago selecionado é então identificado por sequenciamento e disponível para diversas análises, assim como o fago, propriamente. Fonte: Adaptado (GAGIC *et al.*, 2016).

Metodologicamente, os ciclos de *biopanning* se iniciam com a adesão do receptor-alvo a uma superfície sólida, seguido do bloqueio dos sítios livres na superfície impedindo ligações inespecíficas, a partir do emprego de soluções com proteínas de

baixo peso molecular e normalmente não-reativas. Sequencialmente, realiza-se a incubação com bibliotecas de fagos expondo as moléculas exógenas em sua superfície, posterior etapa de lavagem para a retirada de clones inespecíficos e a eluição do fago específico, que se ligou ao receptor-alvo, a partir de uma solução ácida (como tampão glicina pH 2,2), que irá romper a ligação dos fagos com o alvo (WILLATS, 2002).

Resumidamente, após rodadas sucessivas de ligação, lavagem, eluição e amplificação, uma biblioteca de fagos originalmente diversificada, contendo até  $10^{12}$  variantes, é cada vez mais refinada com clones mais específicos e com propensão para se ligar à molécula alvo (SCHIER *et al.*, 1996). Por fim, as populações de fagos monoclonais selecionadas e com especificidades desejadas podem ser identificadas por sequenciamento e submetidas às análises subsequentes (GAGIC *et al.*, 2016; SMITH, GEORGE P.; PETRENKO, 1997).

É evidente o potencial desta metodologia e o grande impacto na imunologia e biologia celular, por permitir a descoberta de novos fármacos, vacinas e melhoria dos testes diagnósticos em geral; a rápida identificação e caracterização de peptídeos ligantes frente a uma variedade de moléculas, como as imunoglobulinas, envolvidas diretamente na resposta imune a agentes infecciosos (LARRALDE *et al.*, 2007).

A estratégia para identificar mimotopos específicos nas leishmanioses a partir do *Phage Display* usando soros de cães foi previamente estabelecida em nosso grupo de pesquisa (COSTA *et al.*, 2014), para o diagnóstico e vacina contra a LVC e, também, a partir de soros humanos para o diagnóstico da LT (COSTA *et al.*, 2016) e LV (SALLES *et al.*, 2017). Com isso, a partir do *know-how* do grupo, o presente trabalho buscou a utilização desta ferramenta para avaliação de bacteriófagos como imunógenos contra *L. infantum*, a fim de seu futuro emprego como vacina na LV humana.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a imunogenicidade e eficácia protetora de bacteriófagos selecionados por *Phage Display* como candidatos à vacina em camundongos BALB/c contra a leishmaniose visceral.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Selecionar clones de bacteriófagos recombinantes que expressem mimotopos de *Leishmania*;
- Identificar os clones capazes de induzir resposta Th1 polarizada por meio de índices de seletividade e especificidade a partir de experimentos *in vitro* utilizando PBMCs humanas;
- Analisar por Bioinformática possíveis epítopos do proteoma de *Leishmania* que foram mimetizados pelos peptídeos expostos nos clones selecionados;
- Imunizar camundongos BALB/c com os clones selecionados e avaliar a resposta celular antes e após a infecção desafio, que será realizada com a espécie *L. infantum*, por meio da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-12 e GM-CSF por ELISA de captura e citometria de fluxo; bem como pela dosagem de óxido nítrico;
- Avaliar a resposta humoral nos animais pela determinação dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a específicos aos imunógenos e parasitos;
- Avaliar o grau de proteção nos animais imunizados e infectados por meio da determinação da carga parasitária no linfonodo, baço, fígado e medula óssea pela técnica de diluição limitante e RT-PCR.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

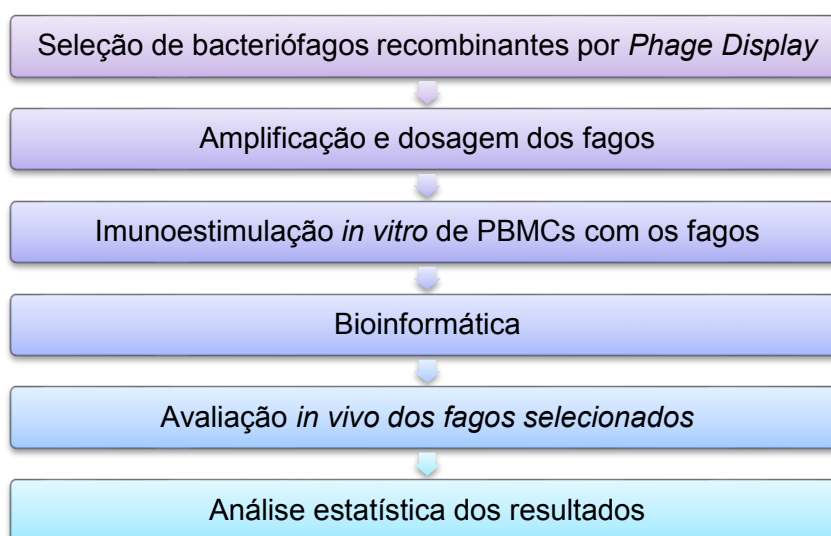
### 4.1. Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), com o número de protocolo CAAE-32343114.9.0000.5149 (**ANEXO I**). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de cada indivíduo que forneceu amostra de sangue para a pesquisa, que recebeu uma cópia individual da política de estudo, revisada por uma pessoa independente. As amostras foram obtidas a partir de pacientes do Hospital das Clínicas/UFMG e seus ambulatórios anexos.

Os experimentos com camundongos BALB/c foram realizados de acordo com as diretrizes e recomendações brasileiras sobre experimentação e bem-estar animal. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Pesquisa da UFMG (CEUA), sob o protocolo número 225/2017 (**ANEXO II**).

### 4.2. Delineamento do projeto

No presente estudo, propomos a validação de dois clones de bacteriófagos que apresentaram elevada imunogenicidade em experimentos *in vitro*. Primeiramente, foi realizada a seleção de clones de bacteriófagos recombinantes, seguida da avaliação *in vitro* usando PBMCs de pessoas saudáveis e de pacientes com LV frente ao estímulo com os fagos; a predição de epítopos miméticos de *Leishmania infantum* por bioinformática e finalmente os ensaios *in vivo* pela imunização de camundongos BALB/c e posterior infecção experimental com *Leishmania infantum* (**Figura 7**).



**Figura 7.** Fluxograma da sequência de experimentos realizada no projeto.

### 4.3. Amostras de sangue

Amostras de sangue de 10 pessoas saudáveis e não infectadas foram coletadas, sendo 20 mL de cada em tubos heparinizados e sem anticoagulante. O sangue foi coletado de sete homens e três mulheres, com faixa etária entre 24 a 51 anos, residentes em área endêmica de LV (Belo Horizonte). Tais indivíduos não apresentaram qualquer sinal ou sintoma da doença e resultado negativo para a presença de anticorpos anti-rK29 no teste Kalazar Detect® (InBios International, USA).

Amostras de 10 pacientes com LV ativa foram coletadas. Os mesmos desenvolviam anemia, hepatoesplenomegalia e apresentaram diagnóstico confirmado por PCR com a detecção do kDNA de *L. infantum* em aspirados de baço e/ou de medula óssea (n=10, sendo 6 do sexo masculino e 4 do sexo feminino apresentando idades variando de 22 a 56 anos). Sete pacientes assintomáticos, que mostraram resultados serológicos positivos pelo teste Kalazar Detect® (InBios International, USA), além de resultados parasitológicos positivos por PCR, mas sem sinal ou sintoma da doença (n=7, com 5 do sexo masculino e 2 do sexo feminino apresentando idades variando de 27 a 49 anos) foram também utilizados.

### 4.4. Phage Display

#### 4.4.1. Ciclos de Biopanning

Para realizar a técnica de *Phage Display*, inicialmente, foi realizada a purificação de anticorpos IgGs nos soros de pacientes com LV e de indivíduos saudáveis, acoplando-os em microesferas magnéticas (*beads*) conjugadas com proteína G (Dynabeads, Invitrogen) (COSTA *et al.*, 2015; SALLES *et al.*, 2017).

Para prosseguir com os ciclos de *biopanning*,  $10^{11}$  partículas virais de uma biblioteca comercial de bacteriófagos contendo peptídeos fundidos aleatoriamente com a proteína de revestimento pIII do fago filamentososo M13 foram utilizados (Ph.D.® biblioteca-C7C, New England Biolabs, USA). Os mesmos foram diluídos em 250 mL de tampão TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, e 0,1% de Tween 20) e a mistura foi incubada durante 30 min, à temperatura ambiente, com as microesferas acopladas aos anticorpos IgG purificados a partir de indivíduos saudáveis para subtração, que foram capturados magneticamente.



Os fagos remanescentes no sobrenadante (que não se ligaram às IgGs de indivíduos saudáveis) foram recuperados e transferidos para um novo tubo, e foram submetidos a seleções positivas usando IgG de pacientes com LV assintomática e sintomática. O sobrenadante foi removido e os fagos ligados a essas IgGs foram lavados cinco vezes em 1 mL de tampão TBS-T, sendo posteriormente eluídos em 500 mL de tampão glicina 0,2 M, pH 2,0. Em seguida, 75 mL de Tris-base 1M, pH 9,0 foram adicionados para neutralizar o pH ácido da solução.

Após a seleção, 76 clones foram amplificados individualmente em meio LB (Luria Bertani) usando microplacas de cultura estéril (BD Falcon™ clear, 96-well microtest™) como descrito por COSTA (2014) e SALLES (2017). O sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI 3130, utilizando BigDye v3.1 e polímero POP7 (Myleus Biotecnologia®, Belo Horizonte). Para as análises de arquivos de saída AB1, o software de varredura de sequências (Applied Biosystems) foi empregado. De 76 clones, 25 apresentaram sequências peptídicas válidas e foram utilizados para estimular PBMCs humanos.

#### **4.4.2. Amplificação individual dos fagos selecionados**

Para a amplificação dos bacteriófagos foi utilizada uma colônia isolada de *E. coli* ER2738, incubada com meio Lumia Bertani (LB, Sigma: Triptona 10g/L, Extrato de Levedura 5g/L e NaCl 10g/L) adicionado de tetraciclina (10µg/mL) em erlenmeyer (50mL), em incubadora Shaker de bancada a 37 °C (CT-712, Cientec) até apresentarem uma densidade óptica (D.O.) de 0,3, sendo a leitura de absorvância feita por espectrofotometria a 600nm.

As células bacterianas foram infectadas com os três tipos de bacteriófagos, selvagem, irrelevante e os fagos recombinantes selecionados no *Biopanning*, e mantidos em incubadora shaker de bancada por 18 horas (overnight) a 37 °C.

Posteriormente, as culturas foram vertidas em tubos falcon (50mL) e centrifugados a 9000 x g, durante 20 minutos a uma temperatura de 4 °C (Sigma, 3K15, Alemanha). O sobrenadante, contendo as partículas virais completas, foi isolado para novos tubos de crescimento (50mL), adicionado ao volume final 1/5 de Polietilenoglicol 8000 em meio salino (PEG/NaCl; 2,5M NaCl) e mantidos a 4 °C *overnight*, para provocar a precipitação dos fagos. Os tubos contendo os fagos precipitados foram centrifugados a 9000 x g, à temperatura de 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em tampão fosfato salino (PBS 1X; 137mM NaCl,

2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Este último passo foi repetido duas vezes, apresentando um precipitado de coloração branca, posteriormente ressuspendido em PBS 1X e quantificado em espectrofotômetro. Por fim, para promover a sua crio-proteção até sua utilização, os fagos foram armazenados com glicerol 50% a uma temperatura de -20 °C (MOUREZ e COLLIER, 2004).

#### **4.5. Parasitos**

A cepa *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) foi cultivada em meio de cultura Schneider's (Sigma-Aldrich) completo, o qual foi composto pelo meio de Schneider's acrescido com 20% de soro fetal bovino inativado (Sigma), 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4. Os parasitos permaneceram em garrafas de cultivo, sob agitação constante em *shaker*, dentro de estufa biológica à temperatura de 23°C±1°C, sendo que repiques das culturas foram efetuados para a manutenção dos parasitos. A obtenção de extrato solúvel de *Leishmania* (SLA) foi feita a partir de 2 × 10<sup>8</sup> promastigotas/mL. Os parasitos foram centrifugados à 4.000 x g, lavados três vezes com adição de 5 mL de tampão fosfato salino (PBS) estéril. Após cinco ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, a suspensão celular foi centrifugada com uma força de 8.000 × g por 20 min à 4°C e alíquotas foram estocadas em freezer a -80°C (COELHO *et al.*, 2003).

#### **4.6. Avaliação *in vitro* da imunogenicidade dos fagos**

##### **4.6.1. Obtenção de PBMCs**

Amostras de sangue dos indivíduos sadios e de pacientes com LV foram destinadas à obtenção de PBMCs, a fim de se avaliar a imunogenicidade dos clones fagos obtidos no processo de *biopanning*. Para as análises *in vitro*, o sangue coletado foi adicionado, cautelosamente, sobre 10 mL de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1077, Sigma-Aldrich) em tubo Falcon de 50 mL (Nunc™), na proporção 2:1 (sangue/Ficoll) e submetido a centrifugação a 450 x g durante 40 min e à temperatura ambiente. O anel formado, composto de PBMCs, foi recolhido com pipeta de Pasteur e transferido para outro tubo Falcon. As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco®, Sigma-Aldrich), lavadas duas vezes com 40 mL de meio, centrifugadas a 450 x g, durante 10 min à temperatura ambiente e, após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi homogeneizado. As células obtidas foram

ressuspensas em meio RPMI 1640 com SFB (Sigma) e ajustados para um volume final de 1 mL. Procedeu-se à contagem das células em câmara de Neubauer, a partir de 10 µL da amostra e 190 µL de solução de Turck, e o volume final das células ajustado para  $10^7$  por mL (GAZZINELLI et al., 1983; GIUNCHETTI *et al.*, 2007).

#### **4.6.2. Ensaios *in vitro***

Os ensaios *in vitro* foram realizados em placas de cultura celular de fundo chato de 48 poços (Costar®, Cambridge, USA), sendo que cada poço continha 850 µL de meio de cultura (RPMI 1640 complementado com 10% SFB, 1% de estreptavidina, penicilina, 2 mM L-glutamina e 0,1% de β-mercaptoetanol), 50 µL de PBMCs ( $5 \times 10^5$  células/poço) e 100 µL do estímulo: fagos B1, D11 ou fago selvagem ( $10^{10}$  moléculas), SLA *L. infantum* (25,0 µg/mL), ou ConA (2,5 µg/mL). A incubação foi feita em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C durante 5 dias, após o tempo de cultura, os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados em freezer -80°C para posterior detecção de citocinas.

#### **4.6.3. ELISA de captura**

A partir dos sobrenadantes coletados, os níveis de IFN-γ e IL-10 foram medidos por ELISA de captura, utilizando-se kits comerciais (ELISA Humano IFN-γ e IL-10, BD Biosciences®, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram interpolados a partir de uma curva-padrão usando citocinas recombinantes e expressos em picogramas por mililitro (pg/mL). Seguiu-se a correção dos valores e identificação da seletividade e especificidade de cada clone. A especificidade foi definida como a capacidade de cada clone em se ligar ao seu alvo, com base na presença de mimotopos exibidos em sua superfície; enquanto que a seletividade foi definida como a capacidade de cada clone identificar seu alvo cognato em uma mistura de diferentes alvos, como preconizado em outro estudo do grupo (LARRALDE *et al.*, 2007).

Para o cálculo da especificidade, os valores de IFN-γ e IL-10 obtidos de cada clone foram divididos pelos respectivos valores destas citocinas após estímulo com o fago selvagem, utilizando PBMCs de indivíduos não infectados. Com os valores corrigidos, a razão entre IFN-γ e IL-10 foi calculada e o número gerado foi definido como a especificidade do clone. Do mesmo modo, a seletividade foi calculada dividindo-se os valores de IFN-γ e IL-10 obtidos para cada clone pelos respectivos

valores das citocinas após o estímulo de PBMCs de pacientes com LV assintomática e sintomática, usando o fago irrelevante como estímulo. Com os valores corrigidos, a razão entre IFN- $\gamma$  e IL-10 foi calculada e o número gerado foi definido como a seletividade do clone. Após os experimentos de imunogenicidade *in vitro*, dois clones que obtiveram valores maiores que 3,0 foram selecionados.

#### 4.7. Análises por Bioinformática

Os clones B1 e D11 foram então selecionados devido à sua maior indução de resposta Th1 polarizada. Foi então realizada uma predição por meio de ferramenta de bioinformática para identificar possíveis epitopos no proteoma de *Leishmania* que seriam mimetizados pelos fagos em questão, além da previsão de suas características físico-químicas e da proteína do parasito, com sua conformação estrutural.

A biblioteca utilizada para a seleção apresenta peptídeos conformacionais com cisteínas nas bordas, conseqüentemente, as análises foram realizadas com a sequência heptamérica dos mimotopos presentes nos fagos B1 e D11, assim como das sequências aminoácidos (ACxxxxxxxCGGGS) contidas na fusão com a proteína pIII do capsídeo viral, contendo as sequências de início e fim, além da sequência de sete aminoácidos, única para cada fago, como anteriormente descrito (ALVES *et al.*, 2014).

As sequências foram deduzidas com base nos nucleotídeos por meio do servidor ExPasy (<http://web.expasy.org/translate/>) e analisadas pelo programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para prever a presença de peptídeos alvo em proteínas de *Leishmania*, de acordo com o banco de dados GenBank. A função da proteína foi prevista pelo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no alinhamento de pesquisa no servidor UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>) (WANG; LI; WANG, 2009).

As propriedades físico-químicas dos peptídeos expostos nos fagos B1 e D11, tais como peso molecular, hidrofobicidade e ponto isoelétrico foram preditas usando a ferramenta Compute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) e o servidor de banco de dados de peptídeos ([http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction\\_main.php](http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php)). A estrutura tridimensional da proteína que os peptídeos dos fagos apresentaram similaridade foi predita pelo servidor I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). A localização dos epitopos na molécula foi apontada pelo alinhamento 3D-

conformacional entre a molécula e os peptídeos selecionados, usando o software PyMol (<https://www.pymol.org/>) (WANG; LI; WANG, 2009; ZHANG, 2008).

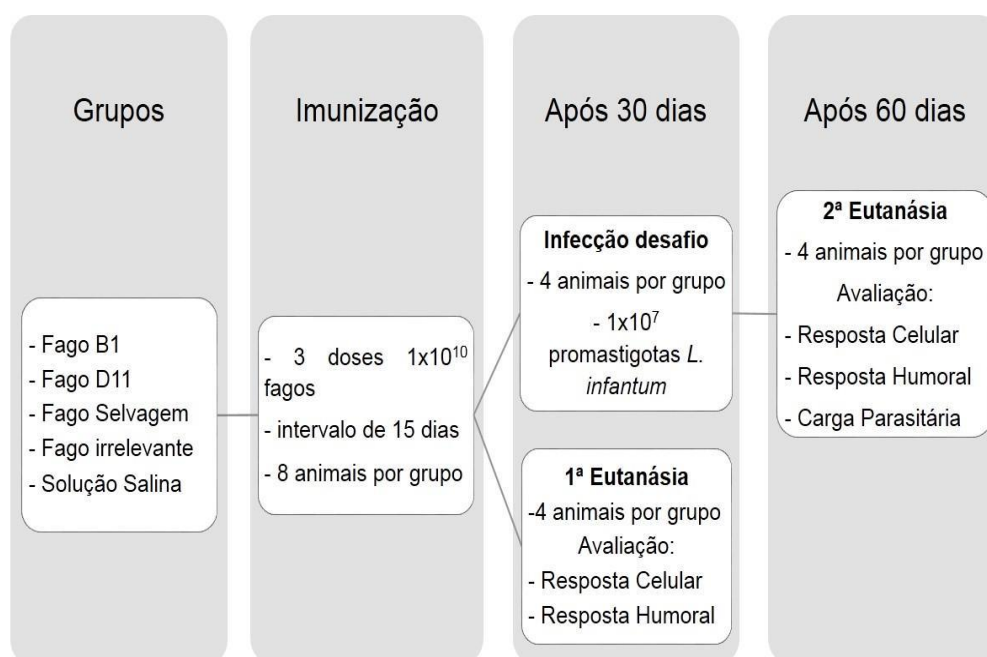
## 4.8. Ensaio *in vivo*

### 4.8.1. Imunização de camundongos

Os experimentos de imunização foram compostos por cinco grupos de camundongos BALB/c (8 semanas de idade; n=8 por grupo), sendo cada qual vacinado por via subcutânea e no coxim plantar esquerdo. Três doses foram administradas ( $10^{10}$  fagos em cada dose), em intervalos de 15 dias, em um volume final de 20  $\mu$ L por animal. No grupo controle foi inoculado PBS na mesma quantidade de volume. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupos	[	a) Grupo controle da infecção – salina (PBS 1x);
Controle		b) Grupo controle do fago – clone selvagem ( $1 \times 10^{10}$ fagos em PBS 1x);
		c) Grupo controle do fago – clone irrelevante ( $1 \times 10^{10}$ fagos em PBS 1x);
Grupos	[	d) Grupo B1 – clone B1 ( $1 \times 10^{10}$ fagos em PBS 1x);
Teste		e) Grupo D11 – clone D11 ( $1 \times 10^{10}$ fagos em PBS 1x).

Após 30 dias da última imunização, a metade do número de animais por grupo (n=4) foi eutanasiada para avaliação da resposta imune celular e humoral gerada pela vacina. Paralelamente, o restante dos animais foram desafiados pela via subcutânea, no coxim plantar direito, com  $10^7$  promastigotas em fase estacionária de *L. infantum*. Os camundongos infectados foram monitorados e, após 60 dias do desafio, foram eutanasiados para a coleta de soro, baço, fígado, linfonodo drenante da pata direita e medula óssea para as avaliações imunológicas e parasitológicas (**Figura 8**).



**Figura 8.** Fluxograma do experimento de imunização.

#### 4.8.2. Avaliação de citocinas extracelulares

Camundongos imunizados e/ou desafiados foram sacrificados para a coleta do baço, para a avaliação das citocinas produzidas após a imunização e infecção desafio. Para tal, 30 dias após a última imunização e antes da infecção, ou 60 dias após o desafio, animais ( $n=4$ , por grupo) foram eutanasiados e o baço foi macerado em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma) completo, que foi constituído por meio DMEM acrescido de 20% de SFB, 4,5 g/L de glicose, 20  $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de gentamicina, 100 U/mL de penicilina e 50  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina, pH 7,4, em placas de cultivo celular de 24 poços (Nunclon, Nunc, Denmark). Após a maceração, foi feita a lavagem das células em meio DMEM incompleto e, em seguida, a lise de hemácias com tampão de lise (Tris HCl 17 mM pH 7,4 e cloreto de amônio 144 mM), por 4 min. As células foram recuperadas por centrifugação (1.500 g por 10 min a 4°C) e ressuspensas em 1 mL de DMEM completo. A seguir, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração final de  $5 \times 10^6$  células por mL, sendo diluídas em meio DMEM completo e plaqueadas em placas de 24 poços. As concentrações dos clones e do SLA de *Leishmania* como antígenos estimuladores foram as menores capazes de induzir à máxima produção de citocinas, definidas através da realização de curva padrão dose-resposta. Concanavalina A (ConA) foi utilizada para o controle da viabilidade celular.

Após o acréscimo dos antígenos, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, com ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 horas. Após, os sobrenadantes foram coletados e utilizados na dosagem de citocinas. O perfil da resposta celular foi avaliado pela produção de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  e GM-CSF nos sobrenadantes das culturas, após a adição dos estímulos. As dosagens foram realizadas pela técnica da ELISA de captura, utilizando-se os kits Intertest Mouse (Pharmingen), de acordo com as instruções do fabricante. Também foi realizada a dosagem de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura, utilizando-se, para tal, o método de Griess.

Paralelamente, para avaliar a participação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na produção de IFN- $\gamma$ , as células de baço dos animais dos grupos B1 e D11 foram estimuladas *in vitro* com o respectivo fago ( $1 \times 10^{10}$  fagos) ou SLA (25  $\mu$ g / mL) e, incubadas, durante 48 h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, na ausência (controle) ou na presença de anticorpos monoclonais (mAb) contra IL-12 de camundongo (C017,8), CD4 (GK 1,5) ou CD8 (53-6,7) (5,0  $\mu$ g / mL, ambos). A produção de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes foi avaliada, e os resultados evidenciados através de gráfico.

#### **4.8.3. Avaliação de citocinas intracelulares**

Adicionalmente à análise de citocinas extracelulares, os esplenócitos de animais imunizados e desafiados foram submetidos à avaliação por citometria de fluxo, para análises da produção interna de citocinas contra antígenos dos parasitos e das células T envolvidas na produção delas. O protocolo utilizado foi semelhante ao descrito por Martins et al. (2017). Os baços retirados dos camundongos foram macerados em macerador, com cerca de 2 mL de RPMI mais 10% de SFB. O volume de cada órgão utilizado foi transferido para um tubo Falcon (Nunc), e completou-se até 10 mL com o meio. Os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm a 18°C e por 7 min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso com 4 mL de meio. As células foram contadas em câmara de Neubauer, a partir da utilização de uma preparação em eppendorf de 10  $\mu$ L da suspensão celular com 190  $\mu$ L de solução de Turk. O volume total da suspensão foi ajustado para  $5 \times 10^6$  células/mL.

Os esplenócitos foram inseridos em tubos de propileno (Falcon, BD Pharmingen) e estimulados com SLA *L. infantum* (25,0  $\mu$ g/mL). No controle negativo, adicionou-se meio RPMI e, para o controle positivo, as células foram estimuladas com PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) (25ng/mL) e ionomicina (1 $\mu$ g/mL, SIGMA). Após os tempos de incubação, foi adicionado Brefeldina A (10 $\mu$ g/mL) aos tubos para induzir o

acúmulo dos marcadores intracelulares e, após processos de lavagens, as suspensões celulares foram plaqueadas com os estímulos em uma placa previamente preparada com os anticorpos monoclonais anti-citocinas. Procedeu-se à leitura no equipamento FACS Calibur® (Becton Dickson, BD), com 30.000 eventos por amostra e a análise dos dados foi feita utilizando o software Cell-Quest™ (BD). A densidade dos gráficos de distribuição de T CD4+/FL1 ou T CD8+/FL1 contra IFN- $\gamma$ /FL-2, TNF- $\alpha$ /FL-2, ou IL-10/FL2 determinaram a porcentagem de células T produzindo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10. Os resultados foram expressos como índices, que foram obtidos pela taxa entre a porcentagem de células T CD4+ e CD8+ presentes nas culturas estimuladas com SLA pelos valores obtidos das culturas sem a adição dos estímulos (DUARTE *et al.*, 2016).

#### 4.8.4. Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi avaliada nos sobrenadantes das culturas pelo método de Griess (ELCICEK; BAGIROVA; ALLAHVERDIYEV, 2013; GREEN, LAURA C. *et al.*, 1982). Após 48 h da incubação de esplenócitos, os sobrenadantes foram coletados para avaliar a concentração de nitrito (NO<sub>2</sub>) determinada pela reação de Griess, e utilizada como indicador da produção de NO. Os sobrenadantes foram adicionados a uma placa de 96 poços e, acrescentou-se o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de naftiletlenamina e 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) aos poços, deixando-os em contato durante 10 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em um leitor de ELISA a 540 nm (Bio-Rad). Os resultados foram expressos como  $\mu$ M de NO com base em uma curva-padrão formada por concentrações conhecidas de nitrito de sódio (diluições de NaNO<sub>2</sub> de 200 a 1  $\mu$ M) dissolvidas em meio de cultura.

#### 4.8.5. Resposta humoral

O perfil da resposta humoral nos animais imunizados e/ou desafiados foi avaliado pela produção dos anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos aos fagos e aos parasitos. Para tal, após o sacrifício, cerca de 1 mL de sangue total dos animais foi retirado pelo plexo braquial. As amostras foram incubadas por 30 min a 37°C e, posteriormente, centrifugadas (1.500 g por 15 min), para a obtenção de soro.

Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de 96 poços (Nunc), utilizando-se, como antígenos sensibilizadores, os clones de fagos ou o SLA de *Leishmania*. As



placas foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em tampão carbonato/bicarbonato (0,1 M e 0,05 M, respectivamente, pH 9,6) e incubadas por 16 horas a 4°C. Em seguida, 3 lavagens foram efetuadas e a solução bloqueadora (PBS 0,15 M pH 7,4 e caseína a 2%) foi acrescentada, mantendo-se as placas por 2 horas e a 37°C. Novamente, as placas foram lavadas 3 vezes e as amostras de soro foram acrescentadas, em duplicata, diluídas em tampão de incubação (PBS 0,15 M pH 7,4; caseína a 0,2% e Tween 20 a 0,05%), sendo mantidas em repouso por 1 hora e a 37°C.

Para a determinação das absorvâncias de anticorpos, as placas foram lavadas 5 vezes e os conjugados anti-IgG total, anti-IgG1 ou anti-IgG2a (Sigma) de camundongo associados à enzima peroxidase (Sigma) foram acrescentados na diluição pré-determinada e diluídos em tampão de incubação, sendo mantidos por 2 horas a 37°C. Após 5 lavagens, a solução reveladora foi acrescentada. Essa foi composta por orto-fenilendiamino (OPD) 0,002%, 0,1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol. e 10 mL de tampão citrato-fosfato, pH 5,0. As placas foram incubadas por 30 min, no escuro, e a reação interrompida pela adição de 20 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. A leitura das absorvâncias foi realizada em leitor de ELISA e no comprimento de onda de 492 nm. Em todos os ensaios, controles positivos e negativos foram utilizados nas placas.

#### **4.8.6. Carga Parasitária**

Decorridos 60 dias da infecção desafio nos animais, a quantificação de parasitos foi realizada nos órgãos pela técnica de diluição limitante. Para tal, fragmentos do fígado, baço, medula óssea e linfonodo drenante dos animais foram removidos, pesados e homogeneizados em meio de Schneider's incompleto (proporção de 100 mg para cada 1 mL de meio de Schneider's sem SFB). Após, foram macerados em triturador de vidro estéril e a suspensão de células obtida foi distribuída em placa de cultura 96 poços (Nunclon, Nunc, Denmark), em duplicata, sendo que diluições sucessivas foram realizadas da ordem de grandeza logarítmica de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-12</sup>. As placas foram incubadas por 7 dias, a 24 °C e, após o tempo decorrido, foram levadas a um microscópio ótico invertido (Axiovert 25, Zeiss) para análise. O resultado final foi determinado pela maior diluição logarítmica que parasitos móveis puderam ser ainda visualizados (COELHO *et al.*, 2003).

Paralelamente, foi realizada a determinação da carga parasitária por RT-PCR. Para tal, o DNA do baço dos animais foi extraído usando um método de fenol-

clorofórmio. A quantificação de parasitos foi calculada por interpolação a partir de uma curva-padrão incluída na mesma corrida e expressa como o número de parasitos por 1.000 células nucleadas em todos os grupos, conforme descrito (FIUZA *et al.*, 2015; LAGE *et al.*, 2016). Os ensaios foram realizados em duplicata. As curvas-padrão foram obtidas a partir do DNA extraído de  $10^8$  parasitos nas mesmas condições utilizadas para realizar a extração das amostras. A PCR foi realizada no aparelho StepOne™ Instrument (Life Technologies USA) em placas de 48 poços, utilizando 5  $\mu$ L SYBR® Green PCR Master Mix (Biosystems USA), com 2 mM de cada iniciador (1  $\mu$ L) e 4  $\mu$ L de DNA (5 ng/ $\mu$ L). As amostras foram incubadas a 95°C durante 10 min e depois submetidas a 40 ciclos de 15 s a 95°C e, a 60°C durante 1 min, e durante cada tempo, os dados de fluorescência foram coletados (DUARTE *et al.*, 2017).

#### **4.9. Análise Estatística**

Para a definição do número de animais a serem utilizados por grupo, utilizamos o programa GraphPad–StateMate. O tamanho amostral foi baseado em relações matemáticas, como definição de variáveis; escolha do tipo de teste estatístico (Teste *t* não-pareado), desvio padrão (usualmente obtido de um piloto ou por revisão de literatura) sendo SD=1,9 e variância=3,6; cálculo do erro tipo a e erro tipo b ( $\alpha=0,05$ ) e ( $\beta=1-\alpha=0,95$ ); poder do teste (capacidade de obter um resultado de diferença estatística quando ele realmente existe, sendo utilizado valor entre 95% e alocação de grupos (vacinado e não-vacinado). Dessa forma, o número de animais por grupo foi de 7, porém, considerando a possível perda de 10% do valor total durante o período do experimento, o número final de animais por grupo foi acertado para 8 animais.

Os resultados foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0) e analisados no GraphPad Prism™ (versão 6.0 para Windows). A avaliação estatística foi realizada por análise de variância unidirecional (ANOVA) e seguida do teste de Bonferroni para comparações entre os grupos. Análises estatísticas utilizando o teste ANOVA e o pós-teste de Tukey para comparação múltipla entre os grupos foram realizadas. As diferenças foram consideradas significativas com probabilidade de significância menor que 0,05 ( $P < 0,05$ ). Os dados apresentados neste estudo são representativos de dois experimentos que apresentaram resultados similares.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Seleção de clones por *Phage Display*

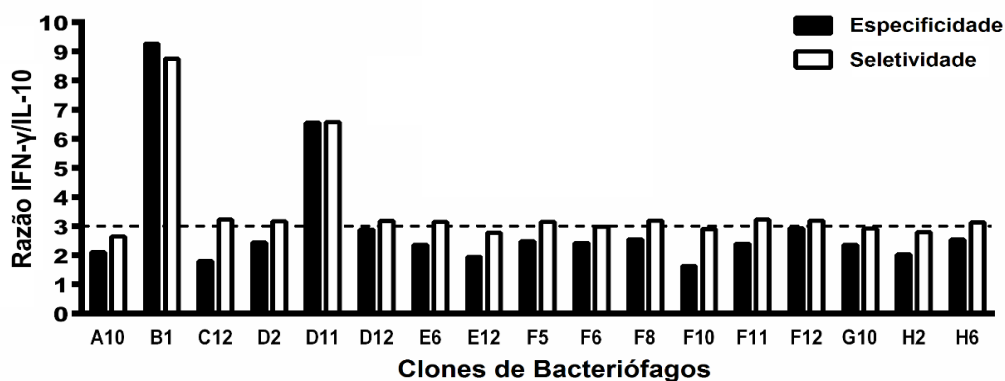
Foi realizada uma estratégia usando anticorpos purificados de soros de indivíduos não infectados e de pacientes com LV assintomática e sintomática, com o objetivo de selecionar imunógenos, sob a forma de clones de bacteriófagos expressando peptídeos de interesse (mimotopos), candidatos contra a LV. Após três ciclos de *biopanning*, 76 clones foram selecionados e sequenciados através do servidor Expasy, obtendo-se 25 sequências válidas de peptídeos. Um alinhamento não mostrou consenso entre as sequências, e nenhuma apresentou ligação não específica com os reagentes usados nos ciclos de seleção.

O número de sequências encontradas foi menor que o inicial, devido à dificuldade de se encontrar as sequências de sete aminoácidos que correspondem ao inserto colocado no genoma do vírus, juntamente com as sequências de aminoácidos (ACxxxxxxxCGGS) contidas na fusão com a proteína pIII do capsídeo viral, que são sinalizadoras de início e fim de cada inserto e que, dessa forma, identificam o peptídeo exógeno do fago.

### 5.2. Avaliação da imunogenicidade dos fagos pela estimulação *in vitro* de PBMCs

Os PBMCs foram purificados das amostras de sangue dos pacientes com LV sintomática e assintomática e de indivíduos não infectados, e foram utilizados para cultivo em placas com estímulos: fagos selecionados por *Phage Display*, fago selvagem, fago irrelevante, ConA e meio sem estímulo. Após o tempo de estímulo das culturas de células, o sobrenadante foi coletado e os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 foram dosados por ELISA de captura. Os valores obtidos para cada clone foram calculados, corrigidos e expressos (**Figura 9**). As barras pretas indicam a especificidade de cada fago, enquanto que as barras brancas indicam a seletividade.

Após a análise da seletividade e especificidade dos fagos, os clones B1 e D11 foram selecionados como obtendo razão IFN- $\gamma$ /IL-10 maior que 3.0. Dessa forma, tais clones foram utilizados para os experimentos *in vivo* em camundongos BALB/c.



**Figura 9.** Índice de seletividade e especificidade dos fagos utilizados como estímulos de PBMCs.

### 5.3. Bioinformática

Ferramentas de bioinformática foram utilizadas para avaliar as propriedades físico-químicas dos fagos selecionados. O ponto isoelétrico, peso molecular e a hidrofobicidade dos clones B1 e D11 foram obtidos, e os resultados são na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Caracterização dos peptídeos miméticos de antígenos de *Leishmania infantum* selecionados por Phage Display.

CLONE	SEQUÊNCIA	PI <sup>a</sup>	HIDROFOBICIDADE	PM <sup>b</sup>
<b>B1</b>	ACVQSWSVRCGGGS	+1	42%	1396,572
<b>D11</b>	ACGPNLLLVC GGGS	0	50%	1254,504

<sup>a</sup>PI: Ponto Isoelétrico

<sup>b</sup>PM: Peso Molecular

Foram realizadas análises de BLAST (**Tabela 2**) para prever a presença de peptídeos alvo frente ao proteoma de *Leishmania*, e se verificou que o peptídeo exposto no fago B1 foi identificado na sequência de uma proteína hipotética (XP\_001470472.1) e da proteína polifosfato cinase-inositol (XP\_001464217.1), enquanto que o peptídeo exposto no fago D11 foi previsto em uma proteína cinase (XP\_001470438.1) e na enzima aminoácido permease (XP\_003392714.1).

**Tabela 2.** Alinhamento Básico Local (BLASTp-NCBI) de peptídeos selecionados com banco de dados da proteína de *Leishmania infantum* cepa JPCM5, antígenos preditivos e suas funções.

Peptídeo	Antígeno preditivo de <i>L. infantum</i>	Cobertura de Alinhamento (%)	Parâmetro de Confiança	Identidade (%)	Função Molecular
B1	Proteína hipotética conservada	50	0.58	100	Proteína não caracterizada
	Proteína cinase inositol polifosfato	85	6.9	100	Atividade cinase (Inositol-1,4,5-trisfosfato 3)
D11	Proteína cinase	42	1.7	100	Atividade cinase
	Aminoácido permease	42	20	83	Componente integrante de membrana

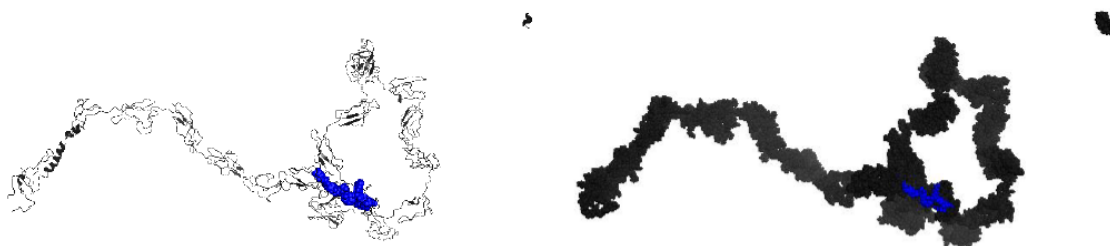
Utilizou-se a sequência da proteína cinase inositol polifosfato para avaliar o alinhamento da região que os peptídeos presentes nos clones de fagos mimetizam (Figura 10).

>XP\_001464217.1 putative inositol polyphosphate kinase-like protein [*Leishmania infantum* JPCM5]

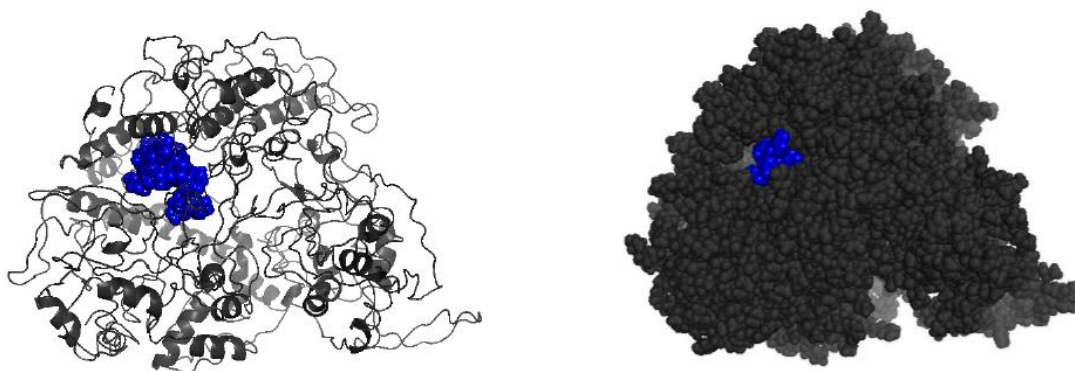
MPKSLSRSTFNAVFEHLSAEEPRSSRQGSANVSFNHPPQQQSPLRPMGQAIDTAVEVVALCDRAEGKPTTSQAEEPLMPLL  
RDMNDDSTDALKLCNSDELGYCSSCEGSLPDDSSASSSEHASRATLPTSVAAALRKDARRKPHSRHRHRYRGRGSLIR  
SAARDEERQRLVAMSFDESTATAKAADSDTTMASPVVLTPAVAATGGAAREGAFKGIPTYPKPIATTTSTKTSLAMISAAL  
NVESRTAEAAKRSNSDSPCSKPGNAVSNTRDAVLPQVQVPVLARDGGGGESAGALCLLGKRDSRDAAEVSIDSAGGDQCIL  
ETSPTAMSRPPTLSPAGTSLAGTAVITSKGSNNGSHSSAIGAGDALQVTSCGAATPPPVDEAACVAVAVGLKRSTVNVHD  
GFVTRTAASVSSCPLQEAQGPSAEPDPDRTLSVPLAGEAAAETTGVAVQATPVAGVATLTSTNATIPLGNAAAETSVKHLQ  
TPSGSPTLVDLSSSSVGGHHLVTEGNAFLKQSGSRREEAFYNMIQPYQEALVREAVRQAPHTVQHWSHQHSGTPCAGVQ  
QGAASAAAASLSSKARHLSPLHTSATQRRRDDSDSVVADPDDVAAMCEARWEAYQQYEAEGMSNLNILASEQLAEKNT  
GRERQRCGGSGCAGPLYNNPPSPTSPRQVDKDLVELAARLWWTVFRHFYRTSAPAYEVQRQAAEAAGLSPLSPLAWS  
PAATTCGSGGAAVTYSLGTTPASQQPHHAPHDSLEAVPPRLPSSPMSASMIEQEKAEHRGEEAAAAPAPNMSGTATPCMVGSF  
AASLLEGLTSSSSAAERQYAAQKRALQLLAAFVPRYHGTRRLFARDVLRCEKGPAAASTAQASEEQPQQPGKQIVVD  
ADNDDDEDNNSGDKKICRMIMLEYVCYFRFRPCVMDIKMGRSQYGLHPSAEKKRSKERKARLSTSARYGIRLAGYRRWN  
ADEGRYNCRSKQLQCRCLSLNEVKSEMSTFLLHSREMEQVFRRLQRLRVAFSQQTIFRFYTSLLFVYDADDPLKTARVTM  
VDFAYTYESKELLQDGDADDFDYDVGYLKALDILLSLA

**Figura 10.** Sequência da proteína utilizada na predição. Região vermelha corresponde à região de alinhamento.

Foi também realizada uma modelagem molecular para prever a estrutura tridimensional da proteína utilizando o servidor I-Tasser, o qual forneceu prováveis estruturas, sendo as modelagens 1 (Figura 11) e 2 (Figura 12) aquelas que apresentaram melhor C-score.



**Figura 11.** Estrutura tridimensional da proteína cinase inositol polifosfato. Modelagem molecular 1.



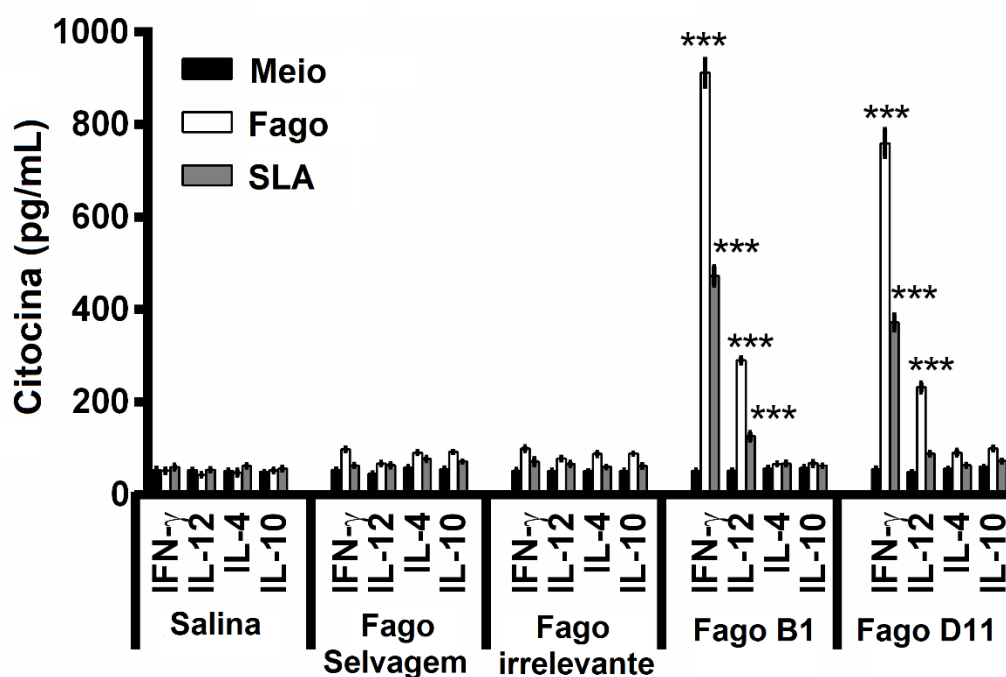
**Figura 12.** Estrutura tridimensional da proteína cinase inositol polifosfato. Modelagem molecular 2

## 5.4. Experimento in vivo

### 5.4.1. Resposta celular

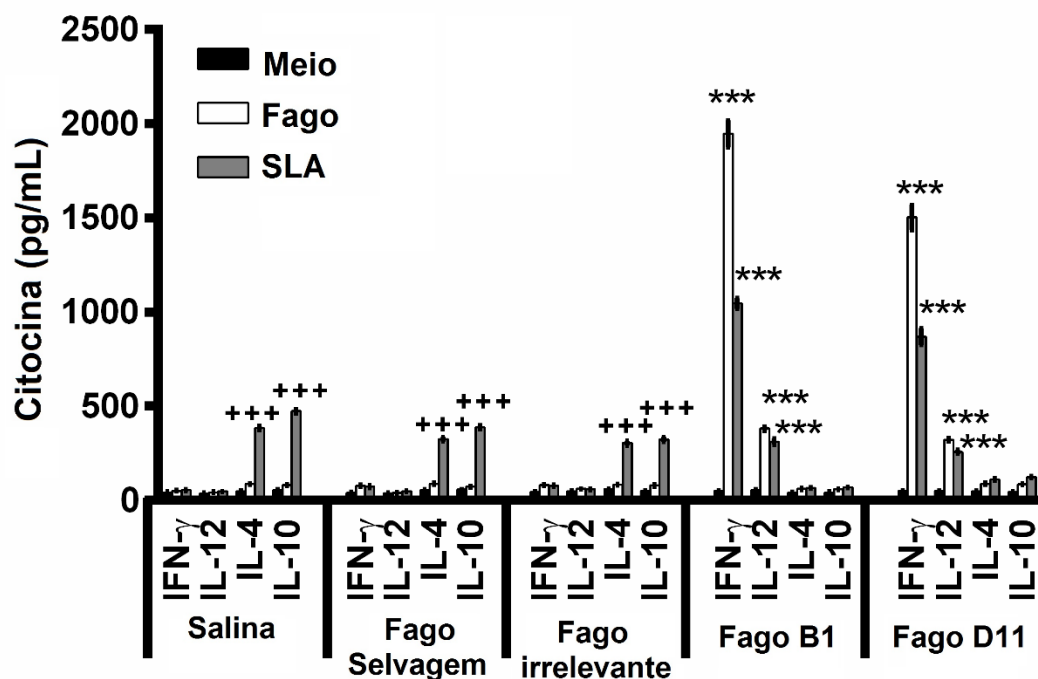
#### 5.4.1.1. Produção de citocinas

A imunogenicidade dos clones B1 e D11 foi avaliada nos camundongos vacinados, 30 dias após a última dose da vacina e antes da infecção (**Figura 13**), bem como 60 dias após o desafio (**Figura 14**). A análise ocorreu pela cultura de células de baço, que foram estimuladas, separadamente, com SLA *L. infantum* (25,0 µg/mL), com cada fago (10<sup>10</sup> fagos) usado na imunização, ou sem estímulo (meio), e permaneceram por 48 h em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Os níveis de IFN-γ, IL-12, IL-4 e IL-10 foram medidos por ELISA, a partir dos sobrenadantes do cultivo *in vitro* de células.



**Figura 13.** Produção de citocinas nos camundongos vacinados.

Barras representam a média ± desvio-padrão dos grupos. (\*\*\*)  $P < 0,0001$  indica diferença estatisticamente significativa dos grupos B1 e D11 em relação aos grupos salina, fago selvagem e irrelevante.



**Figura 14.** Resposta celular dos animais vacinados após a infecção desafio.

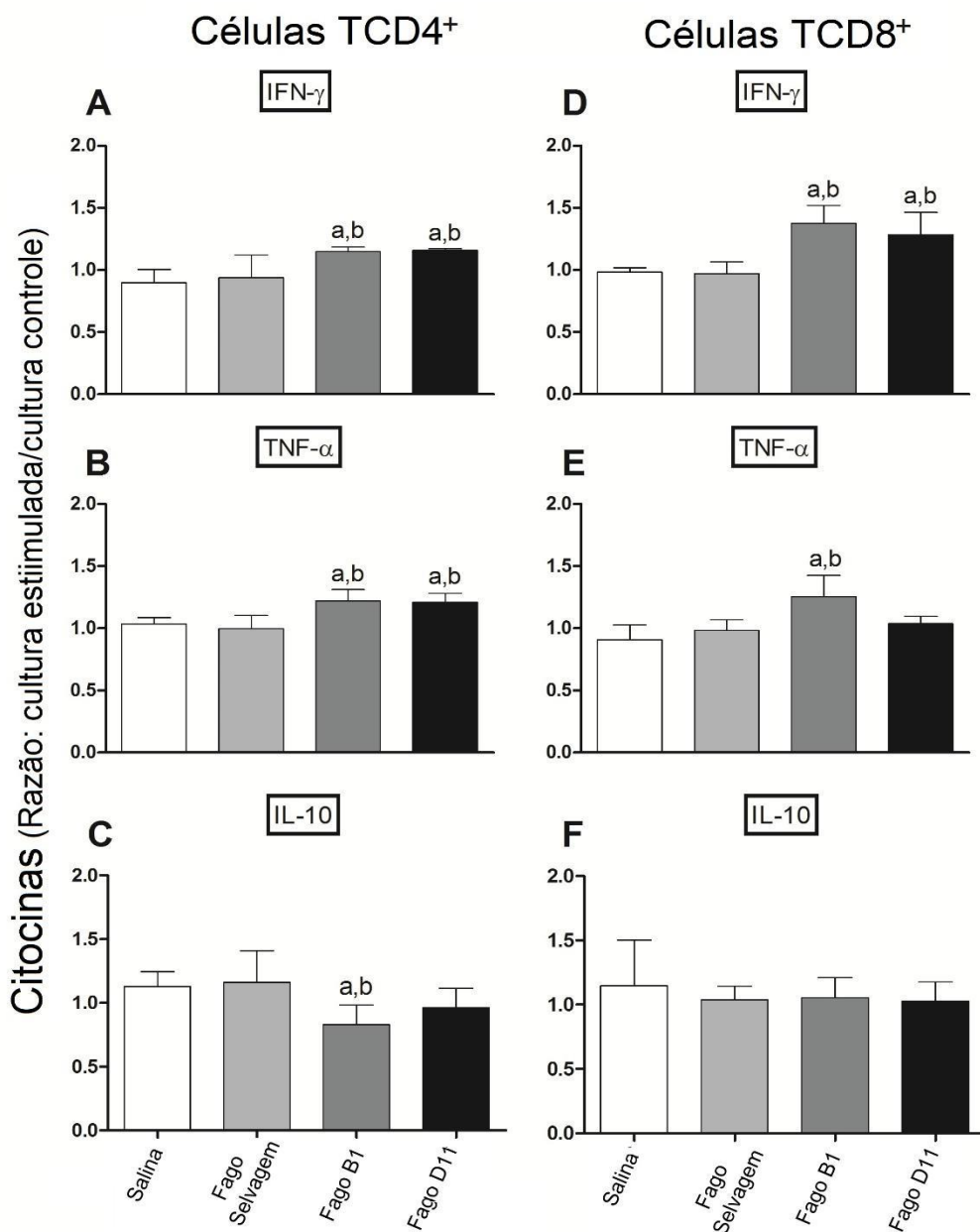
Barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão dos grupos. (\*\*\*)  $P < 0,0001$  indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos B1 e D11 e os grupos salina, fago selvagem e irrelevante.

Após a imunização, os grupos vacinados com os fagos B1 e D11 apresentaram níveis elevados de IFN- $\gamma$  e IL-12, caracterizando uma resposta Th1, ou seja, um perfil imunológico protetor contra a LV (**Figura 13**). Todos os grupos apresentaram baixa produção de IL-4 e IL-10. Após a infecção, observou-se que o perfil de resposta foi mantido inalterado nos grupos B1 e D11, porém, nos animais dos grupos controle, maiores níveis de IL-4 e IL-10 foram observados, mostrando a tendência de tais animais em desenvolver uma resposta do tipo Th2 e o perfil de susceptibilidade à doença (**Figura 14**).

A produção de citocinas intracitoplasmáticas, avaliada por citometria de fluxo, também mostrou que os camundongos vacinados com os fagos B1 e D11 apresentaram níveis significativamente maiores de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidos por células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, associado a baixos níveis de IL-10, quando comparado aos grupos controle (**Fig. 15**).

Os camundongos imunizados e, posteriormente, infectados tiveram seus esplenócitos coletados e estimulados com SLA *L. infantum*. Nos resultados, os índices foram calculados a partir da relação entre as citocinas encontradas na cultura de células estimuladas com SLA, sendo dividida pelo valor encontrado nas culturas do grupo não estimulado (controle) (Razão SLA/Controle).

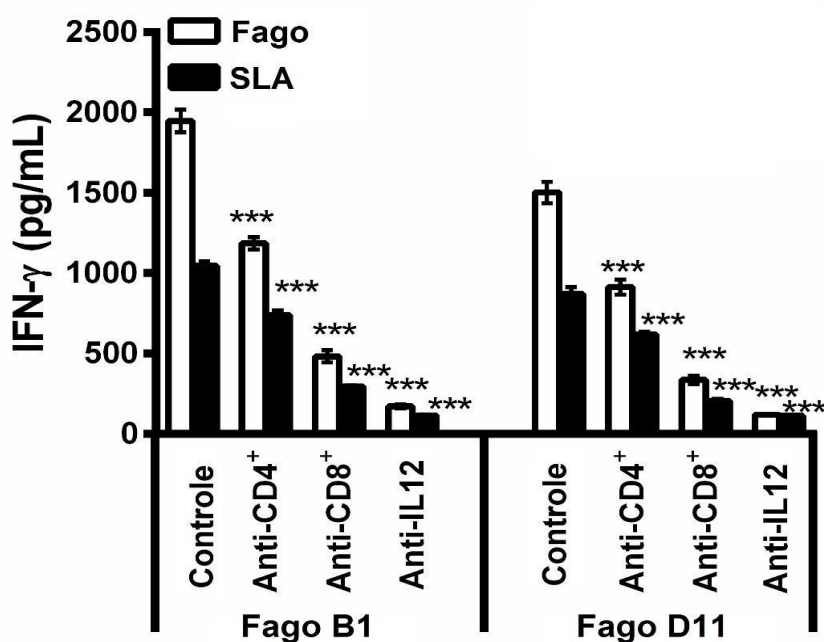




**Figura 15.** Frequência de citocinas Intracitoplasmáticas produzidas por células T após estímulo com SLA *L. infantum*.

Camundongos foram inoculados com salina (barras brancas) ou imunizados com fago selvagem (barras cinza-claro), fago B1 (barras cinza-escuro) ou fago D11 (barras pretas). Os resultados foram relatados como índice de citocinas (índice de cultura estimulada/cultura não estimulada) para células T CD4+ (em A, B e C) e T CD8+ (D, E e F). As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão dos grupos. As letras "a" e "b" indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) em relação aos grupos salina e fago selvagem, respectivamente.

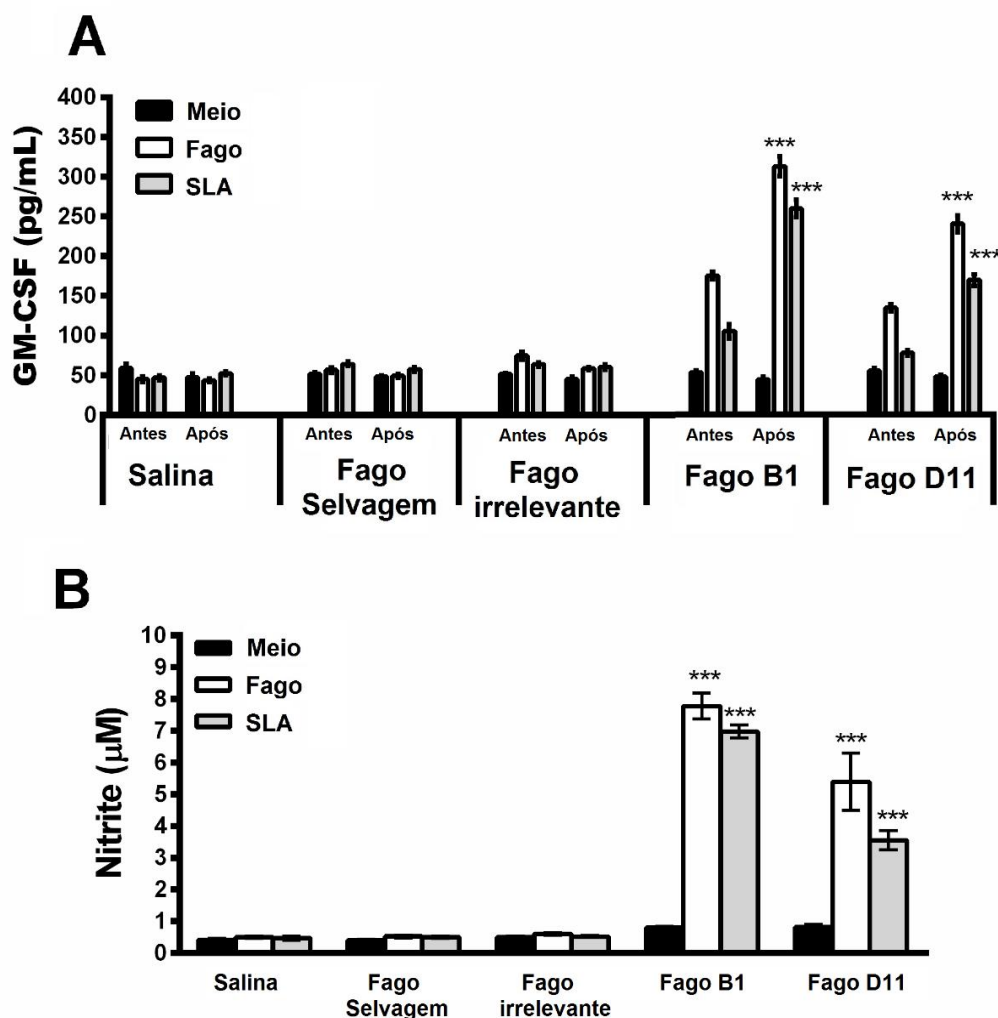
Para avaliar o subtipo de células T envolvido na produção de IFN- $\gamma$  nos animais imunizados com os clones B1 ou D11, anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-IL-12 foram adicionados nas culturas celulares. Nos resultados, observou-se uma menor produção dessa citocina quando anticorpos anti-CD8 foram adicionados às culturas, demonstrando, dessa forma, um papel relevante de tais células na produção de IFN- $\gamma$  nos animais imunizados e infectados (**Figura 16**).



**Figura 16.** Análise do envolvimento de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> na produção de IFN- $\gamma$ . Barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão dos grupos. ( $***P < 0,0001$ ) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (não tratado) e os grupos que receberam anticorpos monoclonais.

#### 5.4.1.2. Ativação de macrófagos

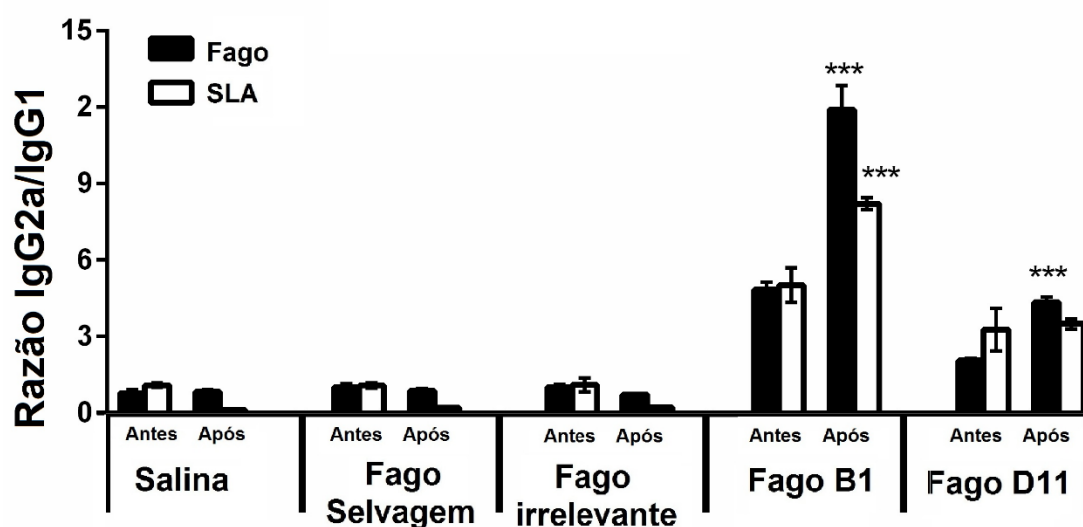
Com o intuito de se verificar mecanismos de ativação de macrófagos, a citocina GM-CSF e a presença de nitrito foram avaliadas nos sobrenadantes das culturas celulares por meio da técnica de ELISA de captura e pela reação de Griess, respectivamente (**Figura 17**). Na análise dos resultados, observou-se uma produção elevada de GM-CSF e nitrito nos grupos vacinados com os fagos B1 e D11, quando comparado com os grupos controle. Tal resultado evidencia uma indução de ativação de macrófagos e produção de espécies oxidativas para o auxílio no combate ao parasito *Leishmania*.



**Figura 17.** Avaliação da ativação de macrófagos nos animais vacinados e infectados. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão dos grupos. (\*\*\*)  $P < 0,0001$  indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos B1 e D11 e os grupos salina, fago selvagem e irrelevante.

### 5.4.2. Resposta Humoral

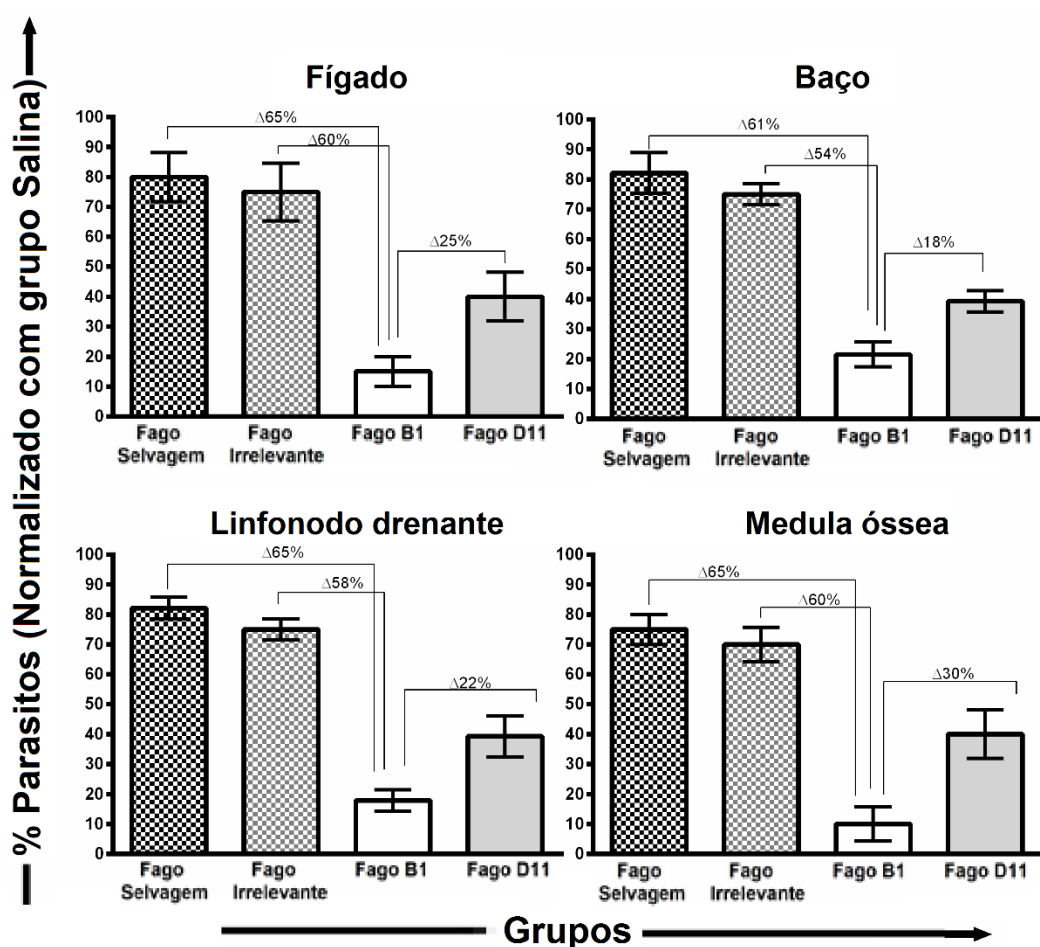
A resposta humoral foi analisada nas amostras de soros de camundongos, antes e após a infecção com *L. infantum*. Os níveis das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a foram determinados a partir da técnica de ELISA indireta, quando a razão entre as mesmas (IgG2a/IgG1) foi calculada para se avaliar a polarização de resposta imune (**Figura 18**). Na avaliação dos resultados, animais dos grupos B1 e D11 apresentaram uma razão IgG2a/IgG1 maior que os demais grupos, tanto usando os imunógenos ou o SLA como antígenos sensibilizadores, denotando a polarização da resposta Th1.



**Figura 18.** Resposta humoral específica aos fagos e parasitos, antes e após a infecção. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão das razões obtidas entre os anticorpos IgG2a/IgG1 anti-SLA (barras brancas) e anti-fago (barras pretas) para cada grupo experimental. (\*\*\*)  $P < 0,0001$  indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos B1 e D11 e os grupos salina, fago selvagem e irrelevante.

### 5.4.3. Carga Parasitária

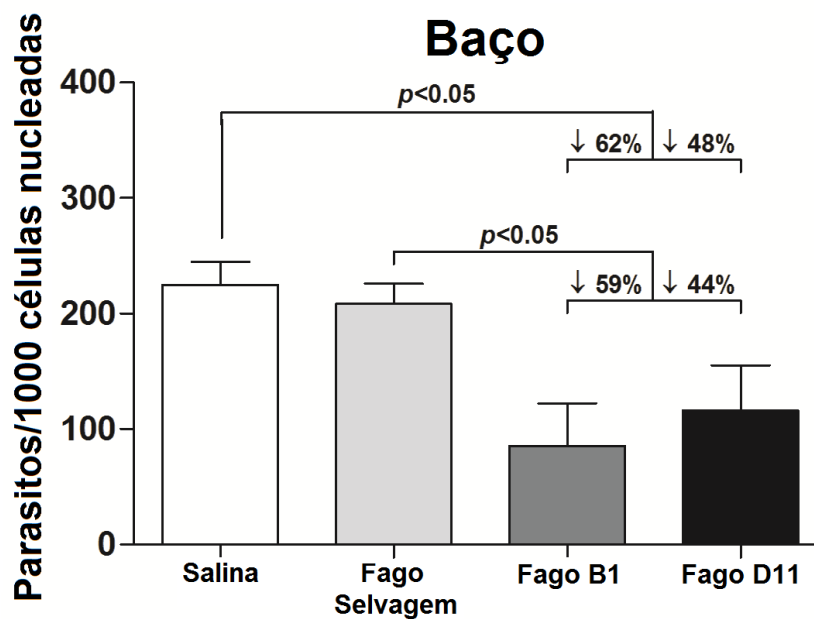
Na avaliação da carga parasitária nos animais, realizada 60 dias após o desafio, reduções significativas na porcentagem de parasitos em todos os órgãos avaliados foram observadas nos camundongos vacinados com fagos B1 e D11, quando comparados aos animais que receberam fago selvagem ou fago irrelevante (**Figura 19**).



**Figura 19.** Avaliação da carga parasitária nos animais vacinados e infectados pela técnica de diluição limitante.

Os valores de carga parasitária de cada grupo foram normalizados com os valores obtidos no grupo salina (controle de infecção). São evidenciados os resultados dos grupos e a relação entre eles. As barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão dos grupos. Diferenças estatísticas em termos percentuais são mostradas.

Em paralelo, a determinação de carga parasitária foi realizada pela técnica de RT-PCR e, nos resultados, reduções significativas no parasitismo dos animais vacinados com os clones B1 e D11 e infectados foram observadas em relação aos demais grupos experimentais (**Figura 20**).



**Figura 20.** Carga parasitária esplênica avaliada por RT-PCR.

A relação de parasitos é expressa pelo número de parasitos por 1.000 células nucleadas, além do percentual de parasitos entre os grupos experimentais. Barras representam a média  $\pm$  desvio-padrão dos grupos. Diferenças estatísticas em termos percentuais são mostradas.

## 6. DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, vários antígenos, tais como A2 (COELHO *et al.*, 2003), NH36 (AGUILAR-BE *et al.*, 2005), proteínas ribossomais (CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. *et al.*, 2010), L3/L5 (RAMIREZ *et al.*, 2014), ciclofilina (SANTOS-GOMES *et al.*, 2014), dentre outros, têm sido avaliados como candidatos vacinais contra a infecção por *Leishmania* spp. Entretanto, nenhuma vacina, eficaz e segura, ainda foi alcançada contra a LV humana.

O desenvolvimento de uma vacina contra a doença é teoricamente possível, uma vez que cerca de 80% de indivíduos infectados por *L. donovani* conseguem eliminar os parasitos espontaneamente, antes do desenvolvimento da sintomatologia da doença (OSTYN *et al.*, 2011). Além disso, cerca de 85% dos pacientes com LV tratados e que apresentaram cura, mostraram-se resistentes à reinfecção por *L. donovani* (ZIJLSTRA *et al.*, 2003).

O rastreio de bibliotecas de bacteriófagos com peptídeos exógenos a partir da técnica de *Phage Display* representa uma alternativa para a busca de novos alvos biológicos com elevada afinidade (SMITH, G., 1985). Novas moléculas com aplicações biológicas distintas foram identificadas por essa tecnologia, resultando em marcadores de diagnóstico, candidatos vacinais e/ou alvos terapêuticos (FELICIANO *et al.*, 2014; LARRALDE *et al.*, 2007; MANHANI *et al.*, 2011). Recentemente, nosso grupo de pesquisa utilizou com sucesso esta tecnologia, a fim de identificar novos candidatos para o sorodiagnóstico (COSTA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016; SALLES *et al.*, 2017) e vacinas (COSTA *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2014) contra a LVC.

Corroborando com os inúmeros achados na aplicação dessa técnica, a mesma possui vantagens tais como a produção em larga escala, mais simples e acessível economicamente dos bacteriófagos, uma vez que os mesmos são produzidos a partir de células de *E. coli* e não geram lise celular bacteriana em seu ciclo, permitindo maior aproveitamento (GAUBIN *et al.*, 2003). Além disso, a amplificação de fagos é mais simples do que os meios convencionais de síntese peptídica e produção de proteínas recombinantes (CUI *et al.*, 2013; DUARTE, MARIANA C. *et al.*, 2016).

Adjuvantes são definidos como moléculas capazes de ativar os receptores expressos em células da imunidade inata de hospedeiros mamíferos, que ocupam e apresentam os antígenos às células T auxiliares gerando melhoria da eficácia da resposta específica para o antígeno (HANDMAN, 2001). No entanto, o uso de tais

adjuvantes tem desvantagens, principalmente, devido à dificuldade na produção e padronização em larga escala, além do baixo número de moléculas disponíveis para uso em vacinas humanas (HASHIGUCHI *et al.*, 2010; MASON *et al.*, 2005).

Bacteriófagos são partículas virais robustas e estáveis em condições adversas, como mudanças de pH e temperatura e são altamente imunogênicos, não exigindo o uso de adjuvantes para sua aplicação como vacina (COSTA *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2016; HASHIGUCHI *et al.*, 2010), diferentemente da maioria das pesquisas que utilizam antígenos recombinantes que necessitam da associação de adjuvantes que induzem uma resposta do tipo Th1 (PEREIRA *et al.*, 2015; THAKUR; KAUR; KAUR, 2015). Tal fato ocorre porque os antígenos utilizados não induzem proteção suficiente quando administrados individualmente, requerendo a adição dos imunoestimuladores (COLER *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2008; MASON *et al.*, 2005; OSTYN *et al.*, 2011).

No presente trabalho, nenhum adjuvante foi associado aos clones B1 e D11 e, ainda assim, os bacteriófagos foram capazes de estimular uma resposta imune Th1. Esses achados estão relacionados à estrutura dos bacteriófagos filamentosos que ativam o sistema imunológico dos hospedeiros mamíferos através de receptores celulares via MHC classe I e II de APCs e podem fornecer epítopos peptídicos apropriados, oferecendo assim um meio poderoso de gerar respostas Th e estimular linfócitos T citotóxicos, ou seja, provocar respostas imunes celulares e humorais. (GAUBIN *et al.*, 2003). Assim, contrastando com peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes que necessitam de adjuvantes, os clones de fagos podem ser, por si só, candidatos vacinais interessantes contra a LV humana (HOUIMEL; DELLAGI, 2009; OSTYN *et al.*, 2011; VAN HOUTEN *et al.*, 2006; VIJAYAMAHANTESH *et al.*, 2016).

Diante disso, o estudo atual propôs a seleção e identificação de clones de bacteriófagos que expressam mimotopos de *Leishmania* avaliados quanto à sua imunogenicidade, primeiramente, por experimentação *in vitro* com PBMCs e, posteriormente, pela imunização de camundongos BALB/c, com o intuito de se desenvolver uma vacina contra essa doença e, que mimetizasse uma resposta imune de pacientes com LV assintomática, ou seja, uma resposta polarizada para um perfil protetor do tipo Th1 (RODRIGUES *et al.*, 2016; VIJAYAMAHANTESH *et al.*, 2017). Esse direcionamento da resposta foi evidenciado pela proporção elevada entre as



citocinas IFN- $\gamma$ /IL-10, que foi apresentada pelos clones B1 e D11, que foram usados nos experimentos de imunização de camundongos BALB/c que, posteriormente, foram desafiados com *L. infantum*.

A partir das análises de bioinformática, foi deduzido que os peptídeos expostos nos fagos B1 e D11 têm similaridade com proteínas cinases. Elas compõem um grupo de proteínas essenciais à sobrevivência dos parasitos, sendo algumas delas já conhecidas, como as caseínas cinases, que agem como reguladoras envolvidas na diferenciação celular, proliferação e segregação cromossômica (DAN-GOOR *et al.*, 2013); participação na glicólise e geração de ATP, como é o caso das piruvato cinases (MORGAN *et al.*, 2010); ou como as cinases de rapamicina, importantes na infectividade do parasito (MADEIRA DA SILVA; BEVERLEY, 2010); ainda as proteínas cinases dependentes de ciclina, envolvidas no ciclo celular do parasito (MAITY; GOSWAMI; SAHA, 2011). Assim, tais proteínas podem atuar em mecanismos específicos do parasito (MAITY; GOSWAMI; SAHA, 2011), representando possíveis alvos terapêuticos e vacinais sem afetar o organismo hospedeiro.

Em relação aos experimentos em camundongos, os fagos B1 e D11 apresentaram êxito na proteção contra a infecção por *L. infantum*, quando comparados aos grupos controle. Este efeito protetor foi evidenciado pela redução significativa na carga parasitária no fígado, baço, medula óssea e linfonodo drenante, sendo os resultados associados ao desenvolvimento de uma resposta Th1 específica, que foi mantida após a infecção. De fato, os esplenócitos dos camundongos vacinados com os fagos selecionados apresentaram produção Th1 específica, com níveis elevados de IFN- $\gamma$ , IL-12, e GM-CSF, que foi combinada com baixos níveis de IL-4 e IL-10, além da presença de anticorpos IgG2a, demonstrando uma resposta dependente de células T (BHOWMICK; ALI, 2009; MENDES *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Uma resposta celular direcionada constitui um ponto de controle importante para regular a resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. Citocinas como a IL-2 regulam a proliferação de células T e a produção de IFN- $\gamma$ ; já o IFN- $\gamma$  e outras, tais como a IL-12 atuam de forma sinérgica exercendo atividade anti-*Leishmania* por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e NO pelos macrófagos. Por outro lado, citocinas como IL-10 exercem um efeito oposto, promovendo a progressão da doença (DUARTE *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2008).

Como forma de reafirmar os dados anteriores, a análise por citometria de fluxo das citocinas intracelulares evidenciou a importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na resposta imune contra *Leishmania* spp., sendo os linfócitos T auxiliares essenciais na produção do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , uma citocina envolvida no processo de ativação celular e recrutamento de neutrófilos. Linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos apresentam também papel importante não apenas na reinfecção, mas também na infecção primária por aumentarem a resposta Th1, com a produção e degranulação de granzimas e perforinas (JOSHI; MALLA; KAUR, 2014; RAMÍREZ *et al.*, 2013).

Paralelamente, como forma de confirmar a ativação de macrófagos, foi realizada a dosagem de nitrito e GM-CSF. Optou-se pela dosagem de nitrito, já que a meia-vida do óxido nítrico é curta por sua rápida oxidação a nitrito e nitrato (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). A glicoproteína GM-CSF é um fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, sendo secretada por células T, macrófagos e células endoteliais e, atua nos progenitores mielóides que residem na medula óssea gerando mobilização de monócitos sanguíneos, ativação de macrófagos e melhora da granulocitopenia (MURRAY *et al.*, 1995). Uma relação direta entre a produção dessa citocina e a diminuição da gravidade da LV foi já relatada (MURRAY *et al.*, 1995). Nossos resultados também mostraram uma correlação entre a produção de nitrito e GM-CSF por parte dos animais imunizados e infectados, corroborando com o perfil de proteção contra a infecção experimental.

Por fim, a análise da carga parasitária mostra interação com a análise imunológica realizada, desde que um elevado parasitismo foi encontrado nos animais dos grupos controles, sendo os animais imunizados com os fagos B1 e D11 aqueles que apresentaram maior redução da carga em todos os órgãos avaliados. Comparativamente, o clone B1 induziu redução com cerca de 20 a 30% menos parasitismo quando comparado aos resultados encontrados no grupo D11. Os dados de carga parasitária condizem com os resultados da resposta celular e humoral, ou seja, nos animais com menos parasitos uma maior produção de citocinas atuantes na resolução da doença foi encontrada, sendo relacionada com o aumento da atividade dos macrófagos e, conseqüentemente, com a eliminação dos parasitos pela produção de espécies oxidativas com conseqüente redução do parasitismo sistêmico.

Com isso, os bacteriófagos, selecionados pela técnica exposta no trabalho, são ótimos candidatos a uma vacina contra a infecção por *Leishmania infantum*.

## 7. CONCLUSÃO

A estratégia experimental desenvolvida neste trabalho mostrou-se válida e muito promissora, uma vez que os dois clones de bacteriófagos expressando peptídeos de interesse, B1 e D11, foram imunoestimulantes de PBMCs de indivíduos saudáveis e pacientes com LV e, eficazes na indução de imunogenicidade e proteção em camundongos BALB/c contra a infecção experimental realizada com a espécie *Leishmania infantum*.

O projeto gerou a submissão e aprovação de um artigo em revista científica internacional QUALIS A1 (**Anexo 3**), além do depósito de patente nacional (**Anexo 4**). Isso agregou ainda mais ao grupo de pesquisa responsável pelo desenvolvimento, que possui excelente *know how* no estudo de doenças infecciosas, principalmente das leishmanioses e, também, na busca por soluções contra esta infecção.

## 8. PERSPECTIVAS

Pretende-se dar continuidade nos experimentos com a realização de ensaios de *Phage* reverso, que se configura na técnica *Phage Display* utilizando-se os fagos B1 e D11 como alvos frente a uma biblioteca de fagos selvagem e permitindo a produção de anticorpos monoclonais contra os peptídeos exógenos, a fim de se identificar as proteínas nativas do parasito que expressam tais mimotopos avaliados como vacinas neste trabalho.

Além disso, a clonagem das proteínas de origem dos peptídeos e a avaliação de sua eficácia protetora contra a infecção por *L. infantum* se faz necessária, a fim de se obter o melhor e mais acessível alvo vacinal para aplicação na prevenção contra essa doença negligenciada.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHYA, Sankar; MERRIL, Carl R; BISWAS, Biswajit. *Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. [S.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

AGALLOU, Maria *et al.* Vaccination with Leishmania histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 30, n. 34, p. 5086–5093, 2012.

AGHEBATI-MALEKI, Leili *et al.* Phage display as a promising approach for vaccine development. *Journal of Biomedical Science*, v. 23, n. 1, p. 66, 2016.

AGUILAR-BE, Ingrid *et al.* Cross-protective efficacy of a prophylactic Leishmania donovani DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 2, p. 812–819, fev. 2005.

ALVAR, Jorge *et al.* *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE*. [S.l.]: Public Library of Science.

ALVES, Patricia Terra *et al.* Revisiting the CD14: Epitope mapping by Phage Display. *Immunobiology*, v. 219, n. 11, p. 822–829, 2014.

ANSARI, Nasim Akhtar *et al.* IL-27 and IL-21 Are Associated with T Cell IL-10 Responses in Human Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 7, p. 3977–3985, 2011.

ARANGO DUQUE, Guillermo; DESCOTEAUX, Albert. *Leishmania survival in the macrophage: Where the ends justify the means. Current Opinion in Microbiology*. [S.l.: s.n.].

BARBAS, C. F. *et al.* Phage Display: A Laboratory Manual. *Analytical Biochemistry*, p. 194–195, 2001.

BHOWMICK, Sudipta; ALI, Nahid. Identification of novel Leishmania donovani antigens that help define correlates of vaccine-mediated protection in visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*, v. 4, n. 6, p. e5820, 5 jun. 2009.

BOGGILD, Andrea K. *et al.* Detection and Species Identification of Leishmania DNA from Filter Paper Lesion Impressions for Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 50, n. 1, p. e1–e6, 1 jan. 2010.

CARVALHO, Bruno *et al.* Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 1, p. 325, 2013.

CHAPPUIS, François *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. S7–S16, 2007.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel A. *et al.* Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. *Microbes and Infection*, v. 12, n. 12–13, p. 967–977, 1 nov. 2010.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel Angel *et al.* New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. [S.l: s.n.].

COELHO, Eduardo Antonio Ferraz *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. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, jul. 2003.

COLER, Rhea N *et al.* From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. *Clinical & Translational Immunology*, v. 4, n. 4, p. e35, abr. 2015.

COSTA, Carlos Henrique Nery *et al.* Vaccines for the leishmaniases: Proposals for a research Agenda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 3, p. e943, 29 mar. 2011.

COSTA, Lourena E *et al.* New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. *Journal of Immunological Methods*, v. 434, p. 39–45, 2016.

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

COSTA, Lourena E. *et al.* Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 21, n. 1, p. 96–106, 2014.

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

CUI, Jing *et al.* Phage-displayed specific polypeptide antigens induce significant protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice. *Vaccine*, v. 31, n. 8, p. 1171–1177, 6 fev. 2013.

D'HERELLE, F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. *Research in Microbiology*, v. 158, n. 7, p. 553–554, 1 set. 2007.

DAMO XU *et al.* Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 15 dez. 1990.

DAN-GOOR, Mary *et al.* Identification of a secreted casein kinase 1 in *Leishmania donovani*: Effect of protein over expression on parasite growth and virulence. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, 2013.

DANNER, S; BELASCO, J G. T7 phage display: A novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 23, p. 12954–12959, 6 nov. 2001.

DE MOURA, Tatiana R. *et al.* Cross-resistance of *Leishmania infantum* isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. *Parasitology Research*, v. 115, n. 2, p. 713–721, 19 fev. 2016.

DIAS, Daniel S. *et al.* Recombinant small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein of *Leishmania infantum*: Potential vaccine and diagnostic application against visceral leishmaniasis. *Molecular Immunology*, v. 91, n. August, p. 272–281, 2017.

DUARTE, Mariana C. *et al.* A vaccine combining two *Leishmania braziliensis* proteins offers heterologous protection against *Leishmania infantum* infection. *Molecular Immunology*, v. 76, p. 70–79, 1 ago. 2016.

DUARTE, Mariana Costa *et al.* A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from *Leishmania braziliensis* cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Immunobiology*, v. 222, n. 2, p. 251–260, fev. 2017.

DUARTE, Mariana Costa *et al.* *Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis.* *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. [S.l.]: SBMT.

EBRAHIMIZADEH, Walead; RAJABIBAZL, Masoumeh. *Bacteriophage vehicles for phage display: Biology, mechanism, and application.* *Current Microbiology*. [S.l.: s.n.].

ELCICEK, Serhat; BAGIROVA, Malahat; ALLAHVERDIYEV, Adil M. Generation of avirulent leishmania parasites and induction of nitric oxide production in macrophages by using polyacrylic acid. *Experimental Parasitology*, v. 133, n. 3, p. 237–242, 2013.

FATAHALIHA, Mostafa Haji *et al.* Analysis of human B cell response to recombinant *Leishmania* LPG3. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 8, n. 8, p. 624–629, 1 ago. 2015.

FELICIANO, N.D. *et al.* Bacteriophage-Fused Peptides for Serodiagnosis of Human Strongyloidiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 5, p. no pagination, 29 maio 2014.

FERNANDES, Ana Paula *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 2008.

FIUZA, Jacqueline Araújo *et al.* Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. *Vaccine*, v. 33, n. 2, p. 280–288, 3 jan. 2015.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções.* *Revista da Associação Médica*

*Brasileira*, v. 46, n. 3, p. 265–271, set. 2000.

FRANCO, Luis H.; BEVERLEY, Stephen M.; ZAMBONI, Dario S. *Innate immune activation and subversion of mammalian functions by Leishmania lipophosphoglycan*. *Journal of Parasitology Research*. [S.l.]: Hindawi.

GAGIC, Dragana *et al.* *Exploring the secretomes of microbes and microbial communities using filamentous phage display*. *Frontiers in Microbiology*. [S.l.]: Frontiers.

GANNAVARAM, Sreenivas *et al.* *Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: Role of coinhibitory molecules*. *Frontiers in Immunology*. [S.l.: s.n.].

GARG, Ravendra; DUBE, Anuradha. *Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis*. *Indian Journal of Medical Research*. [S.l.: s.n.].

GAUBIN, Muriel *et al.* Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments. *DNA and cell biology*, v. 22, n. 1, p. 11–18, jan. 2003.

GAZZINELLI, G.; KATZ, N. ; ROCHA, R. S. ; COLLEY, D. G. . Immune response during human shistosomiasis mansoni. XProduction and standartization of an antigeninduced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of shistosomiasis. *Journal of Immunology (Baltimore)*. USA, v. 89, p. 483-494, 1983.

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

GIUNCHETTI, Rodolfo Cordeiro *et al.* Immunogenicity of a killed Leishmania vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, v. 25, n. 44, p. 7674–7686, 2007.

GONTIJO, CÉLIA MARIA FERREIRA; MELO, Maria norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338–349, set. 2004.

GOTO, H; LINDOSO, J A L. Immunity and immunosuppression in expe. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 4, p. 615–623, 2004.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1 out. 1982.

GREEN, S J *et al.* Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 144, n. 1, p. 278–83, 1 jan. 1990.

GURUNATHAN, Sanjay *et al.* *DNA vaccines: A key for inducing long-term cellular immunity*. *Current Opinion in Immunology*. [S.l.: s.n.]. , 2000

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, n. 2, p. 229–243, 1 abr. 2001.



HASHIGUCHI, Shuhei *et al.* Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 402, n. 1, p. 19–22, 5 nov. 2010.

HOLZMULLER, Philippe *et al.* Leishmania infantum amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 6, n. 3, p. 187–197, 1 maio 2006.

HOUIMEL, Mehdi; DELLAGI, Koussay. Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity. *Vaccine*, v. 27, n. 34, p. 4648–4655, 23 jul. 2009.

JAIN, Keerti; JAIN, N. K. *Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. Journal of Immunological Methods*. [S.l.: s.n.], 2015

JOSHI, Jyoti; MALLA, Nancy; KAUR, Sukhbir. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study. *Parasitology International*, v. 63, n. 4, p. 612–620, 2014.

JOSHI, Trupti *et al.* B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8+ T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 5, 2009.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 1 set. 2001.

KAYE, Paul M. *et al.* The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological Reviews*, v. 201, p. 239–253, 2004.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KHANI JEIHOONI, Ali *et al.* The Effectiveness of Education Based on BASNEF Model Program in Promotion of Preventive Behavior of Leishmaniasis among Health Workers and Families under Health Centers Coverage. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, v. 2, n. 1, p. 26–33, 2012.

LAGE, Daniela Pagliara *et al.* Cross-protective efficacy of Leishmania infantum LiHyD protein against tegumentary leishmaniasis caused by Leishmania major and Leishmania braziliensis species. *Acta Tropica*, v. 158, p. 220–230, 2016.

LARRALDE, Osmany G *et al.* Identification of hepatitis A virus mimotopes by phage display, antigenicity and immunogenicity. *Journal of Virological Methods*, v. 140, n. 1–2, p. 49–58, 2007.

LIMA, Mariana Pedrosa *et al.* Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitology Research*, v. 116, n. 4, p. 1197–1206, 2017.

LUZ, Paula M.; STRUCHINER, Claudio J.; GALVANI, Alison P. *Modeling transmission dynamics and control of vector-borne neglected tropical diseases. PLoS Neglected Tropical Diseases*. [S.l.]: Public Library of Science., out. 2010

MADEIRA DA SILVA, Luciana; BEVERLEY, Stephen M. Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in *Leishmania* shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 26, p. 11965–11970, 29 jun. 2010.

MAITY, Anup Kumar; GOSWAMI, Alakananda; SAHA, Partha. Identification of substrates of an S-phase cell cycle kinase from *Leishmania donovani*. *FEBS Letters*, v. 585, n. 17, p. 2635–2639, 2011.

MANCIANTI, F. *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 4, p. 566–567, 1988.

MANHANI, M. N. *et al.* Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. *Parasite Immunology*, v. 33, n. 6, p. 322–329, 1 jun. 2011.

MAPA. Suspensão da Licença Produto Leishmune. p. 1–12, 2008.

MAROOF, Asher *et al.* Therapeutic vaccination with recombinant adenovirus reduces splenic parasite burden in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 205, n. 5, p. 853–863, 1 mar. 2012.

MARTIN, Virginie *et al.* The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Veterinary Research*, v. 45, n. 1, p. 69, 25 jun. 2014.

MARTINS, Vivian Tamiatti *et al.* Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of *leishmania infantum* against visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. e0137683, 2015.

MARZOCHI, Mauro Célio de A.; MARZOCHI, Keyla Belízia F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 10, n. suppl 2, p. S359–S375, 26 jul. 1994.

MASON, K.A. *et al.* Targeting toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 1, p. 361–369, 2005.

MELBY, Peter C. *et al.* *Leishmania donovani*: Evolution and Architecture of the Splenic Cellular Immune Response Related to Control of Infection. *Experimental Parasitology*, v. 99, n. 1, p. 17–25, 1 set. 2001.

MENDES, Carolina De Oliveira *et al.* IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 21, n. 19–20, p. 2589–2597, 2003.

MILES, Suzanne A *et al.* ARTICLE A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of Experimental Medicine JEM*, v. 0, n. 5, p. 747–754, 2005.

MIRÓ, Guadalupe *et al.* Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 1, p. 52, 13 abr. 2011.

MORENO, Javier *et al.* Use of a liesp/qa-21 vaccine (canileish) stimulates an appropriate th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 6, p. e1683, 2012.

MORENO, Javier; ALVAR, Jorge. *Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. Trends in Parasitology*. [S.l.: s.n.], 2002

MORGAN, Hugh P *et al.* Allosteric mechanism of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* uses a rock and lock model. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 17, p. 12892–12898, 2010.

MOUREZ, M., e COLLIER, R. J. Use of Phage Display and Polyvalency to Design Inhibitors of Protein–Protein Interactions. *Protein-Protein Interactions*, vol. 261, 213–228, 2004.

MS. *Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com*. [S.l.: s.n.], 2015.

MS. *MINISTÉRIO DA SAÚDE Brasília – DF 2006*. [S.l.: s.n.], 2006. v. 2009.

MS. Nota Informativa: Tratamento de cães com leishmaniose visceral. p. 5, 2016.

MURRAY, H W *et al.* Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 95, n. 3, p. 1183–1192, mar. 1995.

NAGILL, Rajeev; KAUR, Sukhbir. *Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. International Immunopharmacology*. [S.l.]: Elsevier.

OGHUMU, Steve *et al.* Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v. 126, n. 3, p. 389–396, 2010.

OMS. Control of the leishmaniasis. *World Health Organization technical report series*, n. 949, 2010.

OMS. Country General Information, Brazil. *Who*, p. 2013–2014, 2016.

OMS. Frequently asked questions on Visceral leishmaniasis (Kala-Azar). 2013.

OMS. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. v. 92, n. 92, p. 557–572, 2017. OPAS\_OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. *Informe Leishmanioses*, v. 2, p. 1–8, 2017.

OPAS\_OMS. Programa Regional de Leishmanioses. Américas 2010-2017. p. 44–50, 2013.

OSTYN, Bart *et al.* Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in High-Endemic foci in India and Nepal: A prospective study. *PLoS*

*Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 10, p. e1284, 4 out. 2011.

PALATNIK-DE-SOUSA, Clarisa B. *Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Vaccine*. [S.l: s.n.].

PARMLEY, Stephen F.; SMITH, George P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v. 73, n. 2, p. 305–318, 20 dez. 1988.

PEREIRA, Lais *et al.* Vaccination with *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 but Not with Nucleosomal Histones Proteins Controls *Leishmania infantum* Infection in Hamsters. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 2, 2015.

PRUDENCIO, Carlos Roberto *et al.* In silico analysis for identification of tick phagotopes selected by phage-displayed libraries. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, v. 18, n. 1, p. 39–41, 2009.

RAMIREZ, Laura *et al.* Cross-protective effect of a combined L5 plus L3 *Leishmania major* ribosomal protein based vaccine combined with a Th1 adjuvant in murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 3, 2014.

RAMÍREZ, Laura *et al.* Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the *Leishmania major* recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, v. 31, n. 9, p. 1312–1319, 2013.

RODI, Diane J.; MAKOWSKI, Lee. *Phage-display technology - Finding a needle in a vast molecular haystack. Current Opinion in Biotechnology*. [S.l: s.n.], 1999

RODRIGUES, Vasco *et al.* Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasites & Vectors*, NULL, v. 9, n. 1, p. 118, 2016.

SALLES, Beatriz C.S. *et al.* *Leishmania infantum* mimotopes and a phage–ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 87, n. 3, p. 219–225, 2017.

SALMOND, George P. C.; FINERAN, Peter C. A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 12, p. 777–786, 2015.

SANTOS-GOMES, G. M. *et al.* Immunization with the *Leishmania infantum* recombinant cyclophilin protein 1 confers partial protection to subsequent parasite infection and generates specific memory T cells. *Vaccine*, v. 32, n. 11, p. 1247–1253, 5 mar. 2014.

SANTOS, P. L. *et al.* *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, v. 27, n. 1, p. 67–71, 2012.

SCHIER, Robert *et al.* Isolation of High-affinity Monomeric Human Anti-c-erbB-2 Single chain Fv Using Affinity-driven Selection. *J. Mol. Biol*, v. 255, n. 1, p. 28–43, 12 jan.

1996.

SCHMITZ, U *et al.* *Phage display: A molecular tool for the generation of antibodies - A review.* *Placenta*. [S.l.: s.n.].

SCOTT, P *et al.* Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 139, n. 9, p. 3118–25, 1 nov. 1987.

SEVÁ, Anaiá P. *et al.* Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PloS one*, v. 11, n. 7, p. e0160058, 2016.

SHARMA, Mahesh *et al.* A systematic reconstruction and constraint-based analysis of *Leishmania donovani* metabolic network: identification of potential antileishmanial drug targets. *Mol. BioSyst.*, v. 13, n. 5, p. 955–969, 2 maio 2017.

SMITH, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 14 jun. 1985.

SMITH, George P.; PETRENKO, Valery A. Phage Display. *Chemical Reviews*, v. 97, n. 2, p. 391–410, abr. 1997.

SOUZA, Carina Margonari De *et al.* Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 8, p. 795–803, dez. 2004.

SPECTHRIE, Leon *et al.* Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage. *Journal of Molecular Biology*, v. 228, n. 3, p. 720–724, 5 dez. 1992.

SRIVASTAVA, Saumya *et al.* Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 277, 2016.

SRIVIDYA, Gurumurthy *et al.* *Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade.* *Parasitology Research*. [S.l.]: Springer-Verlag.

STANLEY, Amanda C; ENGWERDA, Christian R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology*, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.

SUNDAR, Shyam; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 9, n. 5, p. 951–958, 1 set. 2002.

SUTTERWALA, Fayyaz S *et al.* Selective Suppression of Interleukin-12 Induction after Macrophage Receptor Ligation. *J. Exp. Med.*, v. 185, n. 11, p. 1977–1985, 1997.

SZALAI, K.; JENSEN-JAROLIM, E. *Vaccination strategies based on the mimotope concept.* *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*. [S.l.: s.n.].

TAN, Yuyu *et al.* *Advance in phage display technology for bioanalysis.* *Biotechnology Journal*. [S.l.]: WILEY-VCH Verlag.

TEIXEIRA, Maria Jania *et al.* *Chemokines in host-parasite interactions in*

*leishmaniasis. Trends in Parasitology*. [S.l.: s.n.].

THAKUR, Ankita; KAUR, Harpreet; KAUR, Sukhbir. Studies on the protective efficacy of freeze thawed promastigote antigen of *Leishmania donovani* along with various adjuvants against visceral leishmaniasis infection in mice. *Immunobiology*, v. 220, n. 9, p. 1031–1038, set. 2015.

VAN HOUTEN, N E *et al.* Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. *Vaccine*, v. 24, n. 19, p. 4188–4200, 8 maio 2006.

VIJAYAMAHANTESH *et al.* Immuno-informatics based approaches to identify CD8+ T cell epitopes within the *Leishmania donovani* 3-ectonucleotidase in cured visceral leishmaniasis subjects. *Microbes and Infection*, v. 19, n. 6, p. 358–369, 1 jun. 2017.

VIJAYAMAHANTESH *et al.* Up regulation of A2B adenosine receptor on monocytes are crucially required for immune pathogenicity in Indian patients exposed to *Leishmania donovani*. *Cytokine*, v. 79, p. 38–44, mar. 2016.

WANASEN, Nanchaya *et al.* L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infection and Immunity*, v. 75, n. 6, p. 2802–2810, jun. 2007.

WANG, Guangshun; LI, Xia; WANG, Zhe. APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. SUPPL. 1, p. D933-7, jan. 2009.

WHITE, A C *et al.* *Leishmania chagasi* antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 2, p. 123–131, fev. 1992.

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

WILSON, D R; FINLAY, B B. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Canadian journal of microbiology*, v. 44, n. 4, p. 313–329, abr. 1998.

ZHANG, Yang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 40, 2008.

ZIJLSTRA, E E *et al.* *Post-kala-azar dermal leishmaniasis. Lancet Infectious Diseases*. [S.l.]: Elsevier.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP)



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

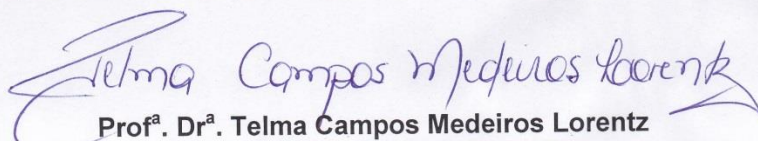
Projeto: CAAE – 32343114.9.0000.5149

Interessado(a): Prof<sup>a</sup>. 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.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Telma Campos Medeiros Lorentz  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO 2. Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Pesquisa da UFMG (CEUA)

- Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 225/2017 (CEUA-UFMG)



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 225/2017

**Título do projeto:** Seleção de mimotopos pela técnica de phage display aplicada no controle das leishmanioses em nosso país

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Eduardo Antonio Ferraz Coelho

**Unidade:** Colegio Técnico

**Departamento:** Colegio Técnico

**Situação atual:** Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 25/09/2017. Validade: 25/09/2017 à 24/09/2022  
Belo Horizonte, 25/09/2017.



## ANEXO 3. Artigo

Ramos et al. *Parasites & Vectors* (2017) 10:617  
 DOI 10.1186/s12875-017-2576-8

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access



## Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection

Fernanda Fonseca Ramos<sup>1</sup>, Lourená Emanuele Costa<sup>1</sup>, Daniel Silva Dias<sup>1</sup>, Thais Teodoro Oliveira Santos<sup>1</sup>, Marcella Rezende Rodrigues<sup>1</sup>, Daniela Pagliara Lage<sup>1</sup>, Beatriz Cristina Silveira Salles<sup>1</sup>, Vivian Tamiotti Martins<sup>1</sup>, Patrícia Aparecida Fernandes Ribeiro<sup>1</sup>, Miguel Angel Chávez-Fumagalli<sup>1</sup>, Ana Carolina Silva Dias<sup>2</sup>, Patrícia Terra Alves<sup>2</sup>, Érica Leandro Marciano Vieira<sup>1</sup>, Bruno Mendes Roatt<sup>3</sup>, Daniel Menezes-Souza<sup>1,4</sup>, Mariana Costa Duarte<sup>1,4</sup>, Antonio Lúcio Teixeira<sup>1,3,5\*</sup>, Luiz Ricardo Goulart<sup>2,6†</sup> and Eduardo Antonio Ferraz Coelho<sup>1,6†\*</sup>

### Abstract

**Background:** The development of a vaccine for the prevention of visceral leishmaniasis (VL) still represents a significant unmet medical need. A human vaccine can be found if one takes into consideration that many people living in endemic areas of disease are infected but do not develop active VL, including those subjects with subclinical or asymptomatic infection.

**Methods:** In this study, a phage display was used to select phage-exposed peptides that were specific to immunoglobulin G (IgG) antibodies from asymptomatic and symptomatic VL patients, separating them from non-infected subjects. Phage clones presenting valid peptide sequences were selected and used as stimuli of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from both patients' groups and controls. Those with higher interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )/interleukin (IL)-10 ratios were further selected for vaccination tests.

**Results:** Among 17 evaluated clones, two were selected, B1 and D11, and used to immunize BALB/c mice in an attempt to further validate their in vivo protective efficacy against *Leishmania infantum* infection. Both clones induced partial protection against the parasite challenge, which was evidenced by the reduction of parasitism in the evaluated organs, a process mediated by a specific T helper (Th)1 immune response.

**Conclusions:** To the best of our knowledge, this study is the first to use a rational strategy based on in vitro stimulation of human PBMCs with selected phage-displayed clones to obtain new immunogens against VL.

**Keywords:** Phage display, Peripheral blood mononuclear cells, Antibodies, Immune response, Vaccine, Visceral leishmaniasis

\* Correspondence: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

†Equal contributors

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Clínica de Saúde Infectológica e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## ANEXO 4. Comprovante de depósito de patente



23/08/2016 87016045662

15:28



00.000.2.2.16.0621609.5

## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 019380 0

### Dados do Depositante (71)

#### Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** Universidade Federal de Minas Gerais

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 17217985000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31270-901

**País:** Brasil

**Telefone:** (31) 34094774

**Fax:**

**Email:** patentes@csit.ufmg.br

### Dados do Pedido

**Natureza Patente:** 10 - Patente de invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (64):** "Composições vacinais para proteção contra a leishmaniose visceral, peptídeos sintéticos e usos"

**Resumo:** A presente tecnologia trata de composições vacinais para o tratamento e/ou a prevenção da leishmaniose visceral em mamíferos, compreendida por seis peptídeos sintéticos livres ou expressos na superfície de bacteriófagos não infecciosos, que foram selecionados por meio de uma abordagem proteômica de phage display, para serem aplicados isoladamente ou em possíveis combinações entre os mesmos.