

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

**TECNOLOGIA DE *PHAGE DISPLAY* APLICADA PARA O CONTROLE DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES E
APLICAÇÃO COMO VACINAS CONTRA A DOENÇA**

GERUSA BRANDÃO DE CARVALHO

BELO HORIZONTE

2020

GERUSA BRANDÃO DE CARVALHO

**TECNOLOGIA DE *PHAGE DISPLAY* APLICADA PARA O CONTROLE DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES E
APLICAÇÃO COMO VACINAS CONTRA A DOENÇA**

Tese apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor junto ao referido Programa.

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

BELO HORIZONTE

2020

C331t Carvalho, Gersa Brandão de.
Tecnologia de Phage Display aplicada para o controle da Leishmaniose Tegumentar [manuscrito]: identificação de biomarcadores e aplicação como vacinas contra a doença. / Gersa Brandão de Carvalho. - - Belo Horizonte: 2020.
81f.: il.
Orientador (a): Eduardo Antônio Ferraz Coelho.
Coorientador (a): Lourena Emanuele Costa.
Área de concentração: Ciências da Saúde.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

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

NLM: WR 350

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



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



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

**"TECNOLOGIA DE PHAGE DISPLAY APLICADA PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES E APLICAÇÃO COMO VACINAS
CONTRA A DOENÇA"**

GERUSA BRANDÃO DE CARVALHO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 10 de junho de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho – Orientador/Presidente da banca
UFMG

Dra. Lourena Emanuele Costa - Orientadora
UFMG

Dra. Ana Thereza Chaves
UFMG

Prof. Mario da Silva Giusta
UNA-BH

Profª. Patricia Aparecida Fernandes Ribeiro
UNA-BH

UFMG

Belo Horizonte, 10 de junho de 2020.

Atesto, para os devidos fins, que a defesa de tese da aluna **GERUSA BRANDÃO DE CARVALHO**, in tulada "*TECNOLOGIA DE PHAGE DISPLAY APLICADA PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES E APLICAÇÃO COMO VACINAS CONTRA A DOENÇA*", defendida em 10 de junho de 2020, foi composta pela seguinte Comissão Examinadora: Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Orientador (UFMG), Dra. Lourena Emanuele Costa – Orientadora (UFMG), Dra. Ana Thereza Chaves (UFMG), Prof. Mario da Silva Giusta (UNA-BH), Profª. Patrícia Aparecida Fernandes Ribeiro (UNA-BH), Dra. Grasielle de Sousa Vieira Tavares (UFMG).

Belo Horizonte, 04

de novembro de

2021. EDUARDO

ANTONIO FERRAZ

COELHO

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



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 05/11/2021, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador externo.php?acao=documento_conferir&id_o rgao_ acesso_externo=0, informando o código verificador **1058454** e o código CRC **F36F7279**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bênçãos e por ter colocado em meu caminho pessoas e oportunidades tão especiais e grandiosas;

Aos meus pais, Tony e Lada, pelas orações e pelos momentos de afeto, alegria, compreensão e ajuda;

Ao meu irmão Lau, que sempre esteve comigo em todos os momentos, pelo carinho;

Ao meu marido Marcos, pelo amor, apoio, ajuda e companheirismo sempre;

Ao meu orientador Eduardo, pelo acolhimento, orientação, compreensão e paciência, essenciais para a concretização deste trabalho; obrigada por confiar em mim;

A minha orientadora Lourena, pela amizade e ajuda, pelo incentivo, pelas palavras carinhosas de fé, pelo exemplo de profissionalismo e ser humano;

A toda equipe do laboratório, em especial as colegas Michelle, Thaís e Fê Fonseca pelo suporte, ajuda infinita e compreensão nos momentos difíceis e também nos momentos de diversão;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, pela orientação através das aulas, fornecendo referências teóricas que contribuíram para o meu aprimoramento intelectual;

A UFMG e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, pela oportunidade de poder realizar esta pesquisa;

“Deus é o dono de tudo. Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas tem essa capacidade, mas não tem essa oportunidade. Ele a deu para mim, não sei por quê. Sei que não posso desperdiçá-la.”

(Ayrton Senna)

RESUMO

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças encontradas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, e que podem causar elevada mortalidade e morbidade. A prevenção e o controle da doença são importantes, porém, apresentam limitações devido à dificuldade na interrupção do ciclo do vetor, à toxicidade dos medicamentos e à ausência de vacinas efetivas. Portanto, a melhoria da profilaxia contra a doença é uma necessidade, e a utilização de novas tecnologias, como *Phage Display*, pode proporcionar o alcance de tais objetivos. No presente estudo, bacteriófagos expressando mimotopos específicos para anticorpos IgG de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT) foram selecionados e testados em experimentos *in vitro* para a estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com LT tratados e não tratados, bem como de indivíduos saudáveis, a fim de se avaliar a produção de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-4 (IL-4) nas culturas *in vitro* e definir os melhores candidatos a serem testados em modelo murino. Os clones foram avaliados quanto à seletividade e especificidade, sendo que os clones A4 e A8 foram selecionados por apresentar maiores valores e utilizados em protocolos de imunização de camundongos BALB/c para avaliação da proteção induzida contra a infecção com *Leishmania amazonensis*. Os resultados mostraram uma resposta Th1 polarizada gerada após a vacinação com os clones, baseando-se em níveis significativamente maiores de IFN- γ , IL-2, IL-12, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), além da produção de anticorpos do isotipo IgG2a. Os camundongos vacinados apresentaram reduções significativas da carga parasitária no tecido infectado e órgãos avaliados, quando comparados aos grupos controle. Em conclusão, a tecnologia de *phage display* foi utilizada para identificar novos clones de fagos expressando peptídeos de interesse, que foram capazes de induzir um perfil de resposta Th1 em PBMCs de pacientes com LT e indivíduos saudáveis, bem como eficazes em induzir proteção em camundongos BALB/c contra a infecção causada por *L. amazonensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar; *phage display*; resposta imune; mimotopos; células mononucleares do sangue periférico; vacina.

ABSTRACT

Leishmaniasis comprises a spectrum of diseases found in tropical and subtropical regions of the world that cause high mortality and morbidity. The prevention and control of the disease are important; however, they have limitations due to the difficulty in interrupting the vector cycle, the toxicity of the drugs and the absence of effective vaccines. Therefore, the improvement of vaccine candidates against leishmaniasis is a necessity, and the use of new technologies, such as the Phage Display, could help to achievement such objectives. In the present study, bacteriophages expressing specific mimotopes for IgG antibodies from tegumentary leishmaniasis (TL) patients were selected and tested *in vitro* to stimulate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from treated and untreated TL patients, as well as from healthy individuals, in order to select the best candidate clones to compose a vaccine against disease. The clones were evaluated for the production of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) in the *in vitro* cultures, when selectivity and specificity values were calculated. Those presenting the highest selectivity and specificity values were selected for the *in vivo* experiments. Two clones, A4 and A8, were then selected and used in immunization protocols of BALB/c mice to evaluate the protection against *Leishmania amazonensis* infection. The results showed a polarized Th1-type response generated after vaccination with the clones, based on significantly higher levels of IFN- γ , IL-2, IL-12, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and stimulating factor of granulocyte-macrophage colonies (GM-CSF); as well as by production of IgG2a isotype antibodies. The vaccinated mice showed also significant reductions in the parasitic load in the infected tissue and evaluated organs, when compared with the control groups. In conclusion, a strategy based on phage display was able to identify new mimotopes capable of inducing Th1-type response in PBMCs of TL patients and healthy individuals, being such clones well-successfully tested in BALB/c mice to protect against *L. amazonensis* infection.

Keywords: Tegumentary leishmaniasis; phage display; immune response; mimotopes; peripheral blood mononuclear cells; vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Formas promastigota (A) e amastigota (B) de <i>Leishmania spp.</i>	19
Figura 2 Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp.</i>	21
Figura 3 Representação da estrutura de um fago filamentososo.	32
Figura 4 Estrutura do fago filamentososo M13	34
Figura 5 Fluxograma experimental do trabalho	37
Figura 6 Representação esquemática dos ciclos de <i>biopanning</i>	41
Figura 7 Ilustração da imunização/infecção desafio e eutanásia de camundongos BALB/c.	45
Figura 8 Seletividade e especificidade dos clones de fagos com base na produção específica de IFN- γ e IL-4 por PBMCs.	52
Figura 9 Imunogenicidade induzida em camundongos BALB / c pelos clones de fago A4 e A8.	53
Figura 10 Antigenicidade induzida em camundongos BALB / c pelos clones de fago A4 e A8.	54
Figura 11. Resposta imune gerada após infecção desafio por <i>Leishmania amazonensis</i> em camundongos BALB / c (n=8 por grupo) previamente imunizados com os imunógenos.	55
Figura 12 Antigenicidade após infecção desafio por <i>Leishmania amazonensis</i> camundongos BALB / c (n=8 por grupo) foram imunizados e posteriormente desafiados com o uso de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	56
Figura 13 Ativação de macrófagos avaliada pela produção de nitrito.....	56
Figura 14 Envolvimento de células T CD4+ ou CD8+ na produção de IFN- γ em animais infectados e imunizados. Camundongos BALB/c (n=8 por grupo) foram imunizados com os clones A4 e A8 e posteriormente desafiados usando promastigotas de <i>Leishmania</i> <i>amazonensis</i>	58
Figura 15 Freqüência de células T CD4+ e CD8+ produtoras de citocinas intracitoplasmáticas em animais infectados e imunizados.....	59
Figura 16 Redução do inchaço da pata infectada.....	60
Figura 17 Eficácia protetora contra a infecção por <i>Leishmania amazonensis</i> com a imunização usando clones de fago A4 e A8.....	61
Figura 18 Carga parasitária avaliada pela técnica de RT-PCR.	62
Figura 19 Alinhamento conformacional e regiões imunogênicas em estruturas protéicas... 64	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais espécies responsáveis pelas manifestações clínicas das leishmanioses	22
Tabela 2: Sequências aminoácidos válidas dos fagos mais promissores para formulação de uma vacina contra a Leishmaniose Tegumentar.	44
Tabela 3: Caracterização dos peptídeos miméticos de antígenos de <i>L. amazonensis</i> selecionados por <i>Phage Display</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
µM	Micromolar
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COLTEC	Colégio Técnico
DC	<i>Dendritic cells</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Ff	Fago filamentoso
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LT	Leishmaniose Tegumentar Humana
LV	Leishmaniose Visceral
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
M	Molar
M13	Fago filamentoso classe M13
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
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>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OPD	<i>Ortho-phenylenediamine dihydrochloride</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>Real time-PCR</i>
SFB	Soro fetal bovino
SLA	<i>Soluble Leishmania antigen</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>

Th1 *T Helper 1*
Th2 *T Helper 2*
TNF- α *Tumor necrosis factor-alpha*
UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 As Leishmanioses: epidemiologia.....	18
2.2 Etiologia e ciclo de biológico parasito <i>Leishmania</i> spp.	19
2.3 Manifestações clínicas nas leishmanioses.....	21
2.4 Tratamento das leishmanioses	23
2.5 Medidas de prevenção e controle.....	25
2.6 Resposta imune na leishmaniose tegumentar	27
2.7 Desenvolvimento de vacinas	28
2.8 <i>Phage Display</i>	31
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Delineamento do Estudo	37
4.2 Animais de experimentação	38
4.3 Parasitos	38
4.4 Preparo do extrato solúvel de <i>Leishmania amazonensis</i> (SLA).....	38
4.5 Amostras de sangue.....	38
4.6 Purificação dos anticorpos por acoplamento em microesferas de proteína G.....	39
4.7 Ciclos de <i>Biopanning</i>	40
4.8 Titulações dos clones de fagos.....	41
4.9 Amplificação e extração do DNA dos fagos de interesse.....	42
4.10 Sequenciamento dos clones de fagos selecionados	42
4.11 Análise por bioinformática.....	43
4.12 Definição dos alvos vacinais	43
4.13 Imunização de camundongos BALB/c.....	44
4.14 Infecção desafio.....	45
4.15 Evolução do tamanho da lesão e avaliação da carga parasitária	46
4.16 Isolamento e cultura dos esplenócitos	46
4.17 Dosagem das citocinas	46
4.18 Citometria de fluxo	47
4.19 Avaliação da resposta humoral pela produção de anticorpos IgG1 e IgG2a	48

4.20	Avaliação da carga parasitária	49
4.21	Avaliação da carga parasitária dos animais imunizados com fagos e infectados por <i>L. amazonensis</i> através da técnica de PCR Real Time	49
4.22	Bioinformática, clonagem e purificação da proteína diidroorotato	50
4.23	Análise estatística	50
5.	RESULTADOS	51
5.1	Seleção dos clones de fagos por <i>Phage Display</i>	51
5.2	Avaliação da imunogenicidade dos fagos pela estimulação <i>in vitro</i> de PBMCs	51
5.3	Imunogenicidade induzida por clones A4 e A8 antes da infecção.....	52
5.4	Imunogenicidade induzida por clones A4 e A8 após a infecção.....	54
5.5	Carga Parasitária.....	59
5.6	Bioinformática e mapeamento dos mimotopos A4 e A8.....	62
	64	
6.	DISCUSSÃO	65
7.	CONCLUSÃO	69
8.	PERSPECTIVAS.....	70
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
10.	APÊNDICE	82
10.1	Artigo publicado	82
11.	ANEXOS	84
11.1	Anexo 1: Comprovante de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. 84	
	Anexo 2: Comprovante de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG.....	85

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de parasitos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (ASHFORD, 2000). A doença apresenta uma elevada morbidade e mortalidade, sendo encontrada em 98 países e em três territórios, com cerca de 380 milhões de pessoas expostas aos riscos de infecção (GRAMICCIA *et al.*, 2005). Estima-se que cerca de 2,0 milhões de novos casos ocorram por ano, sendo que 1,0 a 1,5 milhões correspondam a casos de leishmaniose tegumentar (LT) e 500.000 casos são leishmaniose visceral (LV), cuja forma aguda e não tratada causa o óbito de cerca de 50.000 pessoas no mundo (WHO, 2010).

A leishmaniose tegumentar (LT) se caracteriza pela presença de lesão na pele e/ou mucosas dos pacientes, que podem ser únicas ou numerosas, abrangendo desde lesões discretas com evolução para cura espontânea até formas com ulcerações múltiplas (MARZOCHI, *et al.*, 1994). A doença é considerada como uma das seis principais doenças negligenciadas encontradas em países em desenvolvimento (HOTEZ *et al.*, 2004). Pode manifestar-se clinicamente sob as formas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM), sendo a última capaz de causar destruição tecidual extensa e possui forte resistência ao tratamento (WHO, 2014). As espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são importantes espécies dermatrópicas causadoras dessas manifestações clínicas no Brasil (MENDONÇA *et al.*, 2004).

O tratamento clínico das leishmanioses deve ser realizado para se evitar a mortalidade causada pela doença visceral e reduzir a morbidade provocada pelas lesões desfigurantes na LT. A aplicação sistêmica de compostos antimoniais pentavalentes, como o N-metil antimoniato de meglumina (Glucantime®), é o método mais utilizado no Brasil. Entretanto, o fármaco pode causar fadiga, artralgias, mialgias além de toxicidade renal, hepática e cardíaca. Há, também, a dificuldade de transporte dos pacientes, normalmente residentes em áreas rurais, até os centros mais especializados de saúde, para aplicação endovenosa ou intramuscular dos compostos. A anfotericina B constitui a droga de segunda escolha para o tratamento da doença, porém, seu uso também provoca efeitos colaterais e tóxicos aos pacientes. As complicações renais com o uso da anfotericina B são as mais importantes. A filtração glomerular diminui em aproximadamente 40% na maioria dos pacientes, estabilizando-se ao redor de 20 a 60% dos valores normais. Outros sintomas

comuns são: flebite, cefaleia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão. Sua formulação lipossomal é menos tóxica mas apresenta custo elevado (CHAVÉZ-FUMAGALLI *et al.*, 2015).

Devido ao prejuízo das condições de tratamento por diferentes aspectos, ao aumento do número de casos no Brasil e a variação de sensibilidade e especificidade dos antígenos atualmente utilizados nos testes diagnósticos, têm-se a necessidade do desenvolvimento e/ou melhoria de estratégias que possam atuar na prevenção das leishmanioses, como a busca por vacinas eficazes capazes de induzir imunidade protetora. Nesse sentido, as vacinas devem se tornar medida preferencial para o controle das leishmanioses.

Entretanto, devido à diversidade epidemiológica da doença e de espécies que podem causar a infecção, o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses torna-se uma tarefa complexa, embora seja considerada uma solução real para seu controle (GRIMALDI & TESH, 1993; GONZALO *et al.*, 2002; SUKUMARAN *et al.*, 2003; RAMIRO *et al.*, 2003; DESJEUX, 2004). Cabe ressaltar que uma vacina deve conter antígenos que sejam compartilhados por diferentes espécies dos parasitos, e ser preferencialmente imunogênica contra a maioria destas espécies (COELHO *et al.*, 2003).

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/ou 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 trabalho, utilizamos a tecnologia de *Phage Display* para identificar mimotopos expressos na superfície externa de clones de bacteriófagos para serem avaliados como candidatos vacinais contra a LT murina. Os clones foram selecionados por meio de experimentos *in vitro* usando células imunes de pacientes com LT e de indivíduos saudáveis, e

dois deles induziram uma resposta Th1 polarizada. Tais clones foram então testados em experimentos *in vivo* de vacinação experimental em camundongos BALB/c contra a infecção experimental com *L. amazonensis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As Leishmanioses: epidemiologia

As leishmanioses são doenças crônicas, de manifestações cutânea e visceral causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. É considerada como uma antropozoonose de grande interesse na saúde pública mundial, representando um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (VASCONCELOS, 2010).

Atualmente, as leishmanioses encontram-se entre as seis principais endemias no mundo, afetando populações de 98 países, em três territórios, sendo que somente em 32 destes a notificação de casos da doença é compulsória, contribuindo para a deficiência no conhecimento da real magnitude do problema. Espera-se a ocorrência de 2 milhões de novos casos de leishmanioses por ano (cerca de 500.000 novos casos de LV e 1.500.000 casos de LT); o que a coloca como uma das cinco doenças infecto-parasitárias e endêmicas de maior relevância pelo seu alto coeficiente de infecção e pela capacidade de produzir deformidades (ALVAR *et al.*, 2012). Estimativas indicam que cerca de 12 milhões de pessoas estejam infectadas em todo mundo, com uma incidência anual 200.000 a 400.000 casos de Leishmaniose Visceral humana (LVH) e 700.000 a 1.200.000 casos de Leishmaniose Tegumentar (LT), sendo que, em torno de 30.000 casos evoluem ao óbito (ALVAR *et al.*, 2006A; ALVAR *et al.*, 2012).

A população em risco de contrair a doença é estimada entre 300 e 350 milhões de pessoas no mundo (ASHFORD 1996; ASHFORD *et al.*, 1992; DESJEUX 2001A.). Em torno de 90% dos casos de LVH concentram-se em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A LT é mais amplamente distribuída, sendo que um terço dos casos ocorre nas Américas, Mediterrâneo e Ásia Ocidental. Os países com maior número de casos de LT estimados são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru que, em conjunto, representam entre 70 e 75% da incidência de LT global (ALVAR *et al.*, 2012).

O Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (WHO/TDR/2007) estabeleceu a lista das 10 doenças infecciosas prioritárias no mundo; destas, 8 são doenças transmitidas por vetores. Essas doenças são responsáveis por um

grande número de DALYs (*Disability Adjusted Life Years*), um indicador econômico que mede o número de anos de vida produtiva que foram perdidos em decorrência da doença e morte prematura ou invalidez. Nessa lista as leishmanioses ocupam o 3º lugar, perdendo apenas para a malária e filariose linfática (WHO, 2002). (ALVAR *et al.*, 2006B; HOTEZ *et al.*, 2004).

2.2 Etiologia e ciclo de biológico parasito *Leishmania* spp.

Leishmania é um gênero de protozoários da família Trypanosomatidae, que inclui os parasitos causadores das leishmanioses (GRIMALDI & TESH, 1993). O protozoário *Leishmania* pode apresentar-se sob a forma promastigota ou amastigota (Figura 1). As formas promastigotas são formas alongadas, afiladas, com um único flagelo longo que lhes conferem flexibilidade e são encontradas no vetor transmissor da doença. As formas amastigotas são arredondadas, com flagelo rudimentar, infectivas e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero. São parasitos intracelulares obrigatórios, sendo encontradas no interior de células fagocíticas, tais como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células de *Langherans* no hospedeiro vertebrado (SACKS & KAMHAWI, 2001; SACKS & SHER, 2002).

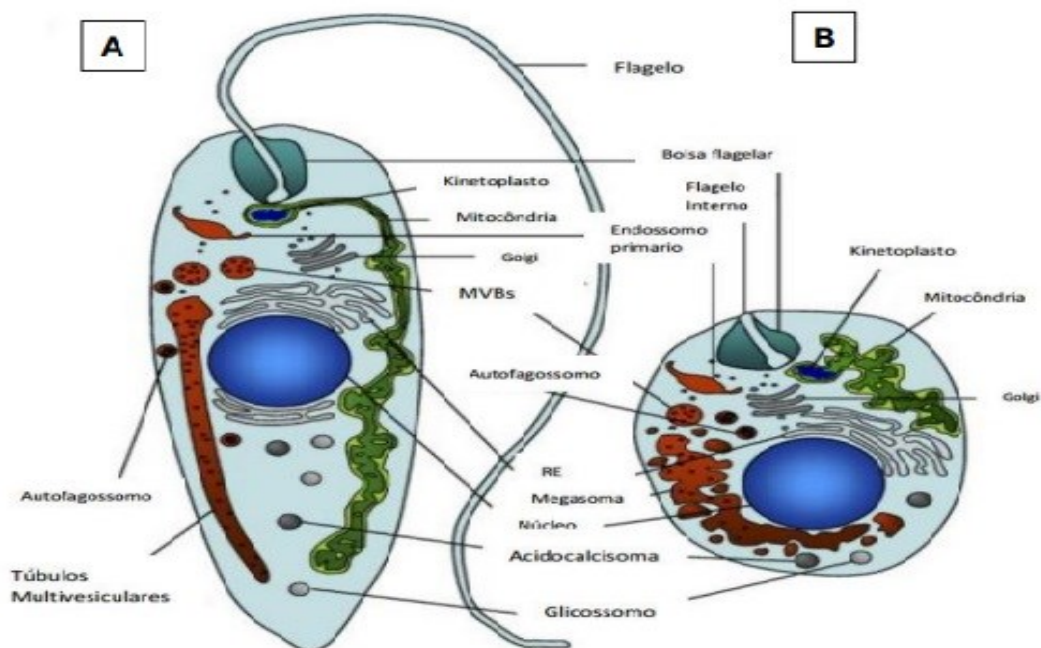


Figura 1 Formas promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania* spp.

Até o presente momento, foram encontradas nas Américas mais de 20 espécies de parasitos, das quais 14 estão relacionadas à leishmaniose tegumentar americana (LTA) humana. No Brasil, sete espécies foram identificadas como agentes etiológicos da LTA, das quais seis pertencem ao subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (V.) lindenbergi* (Lainson et al. 1989; Lainson & Shaw 1987; Silveira et al. 2002; Silveira et al. 1987). A sétima espécie pertence ao subgênero *Leishmania*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (SHAW & LAINSON, 1972). As espécies mais patogênicas ao homem são: *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonenses* (SILVEIRA et al., 2004).

As diferentes espécies são transmitidas através de insetos conhecidos como flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, na Europa, Ásia e África e *Lutzomyia* nas Américas. Os flebotomíneos encontram-se adaptados aos ambientes úmidos e escuros. Eles possuem hábitos crepusculares e noturnos para realizar a hematofagia, que é realizada somente pelas fêmeas, mas algumas espécies possuem hábitos matutinos e vespertinos. A maioria das espécies é silvestre, entretanto, devido às modificações de seu *habitat* pelo homem; sua adaptação ao ambiente domiciliar e peridomiciliar tem sido comum (FORATTINI et al., 1973).

A transmissão do parasito ocorre no momento em que o vetor flebotomíneo fêmea realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, podendo ingerir juntamente com o sangue, formas amastigotas de *Leishmania spp.* livres ou presentes dentro de células fagocíticas infectadas (Figura 2). Essas células, ao alcançarem o intestino do vetor, podem se romper e liberar os parasitos, que se transformam em formas promastigotas procíclicas e migram para o trato digestório médio e anterior do vetor. Os parasitos então passam por multiplicação e diferenciação celular, dando origem às formas promastigotas metacíclicas, que migram para a parte anterior do aparelho bucal do inseto. Quando o vetor infectado realizar novo repasto sanguíneo em um mamífero não infectado, ele pode regurgitar na derme do hospedeiro, formas com elevada motilidade e capacidade migratória chamadas de promastigotas metacíclicas. Logo após, células do sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro, migram para o local e podem fagocitar os parasitos. No interior dos fagolisossomos formados, ocorre à diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, que passam a se replicar. A replicação dos parasitos por divisão binária pode resultar no rompimento das células e, conseqüentemente, na liberação dos parasitos, que

podem ser fagocitados por novas células, levando ao desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero. Assim, um novo vetor não infectado, poderá ingerir células fagocíticas parasitadas deste hospedeiro mamífero, completando o ciclo biológico do parasito (PESSOA & MARTINS, 1988; MEDEIROS *et al.*, 2005).

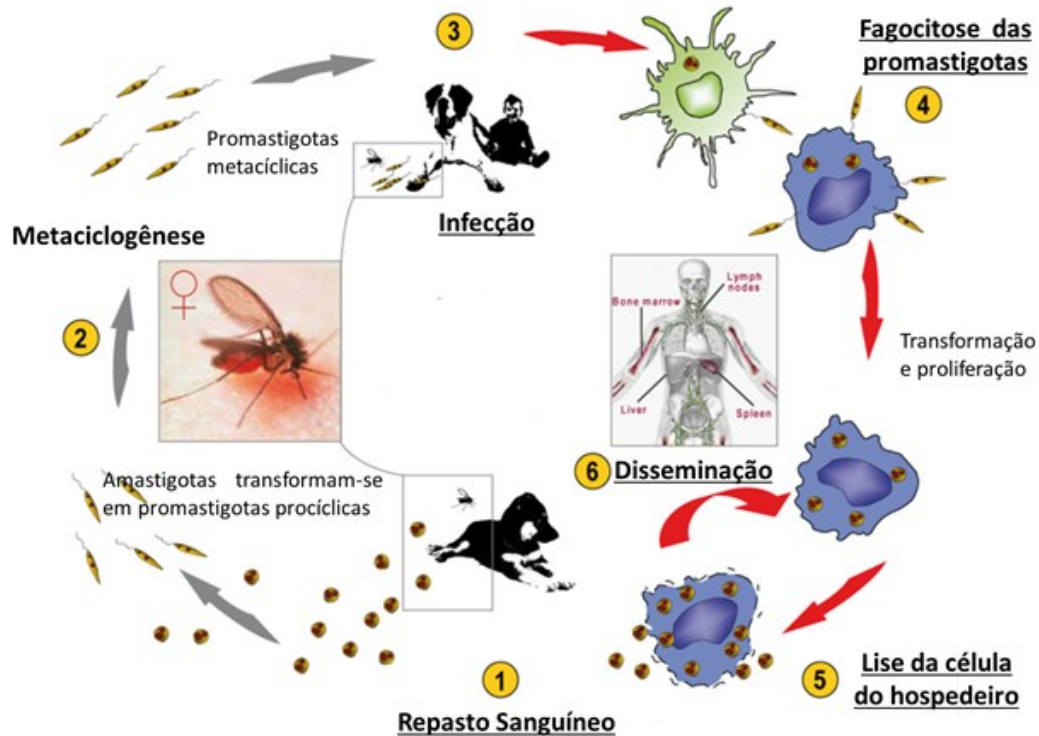


Figura 2 Ciclo biológico do parasito *Leishmania spp.* 1. Infecção do inseto vetor fêmea no momento em que realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado (ingestão de amastigotas). 2. Transformação das formas amastigotas em promastigotas metacíclicas no interior do vetor. 3. Penetração passiva das formas promastigotas metacíclicas e infecção do hospedeiro mamífero. 4. Fagocitose dos parasitos por macrófagos, onde ocorre a transformação em amastigotas e proliferação. 5. Lise da célula hospedeira com liberação das amastigotas. 6. Disseminação dos parasitos para órgãos e tecidos do hospedeiro mamífero e possibilidade de um novo repasto sanguíneo pelo inseto.

2.3 Manifestações clínicas nas leishmanioses

Conforme o tropismo apresentado pelo parasito, a doença pode ser classificada em LT, quando os parasitos se direcionam para a pele e mucosas, principalmente nasal e orofaríngea, e leishmaniose visceral (LV), quando os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides, caracterizando uma doença do sistema retículo endotelial (ASHFORD, 2000).

Espécies distintas de *Leishmania* têm preferências e causam lesões maiores ou menores, produzem ou não metástases e podem ser ou não autolimitadas apresentam características clínicas, patológicas e epidemiológicas diversas, em cada área geográfica, sendo então consideradas entidades nosológicas distintas (ASHFORD, 2000), como mostrado na tabela 1 abaixo:

Tabela 1 Principais espécies responsáveis pelas manifestações clínicas das leishmanioses

Manifestação Clínica	Espécie envolvida	
	Velho Mundo	Novo Mundo
Leishmaniose cutânea	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. amazonenses</i>
Leishmaniose mucosa	-	<i>L. peruviana</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>
Leishmaniose cutâneo-difusa	<i>L. aethiopica</i> <i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. amazonenses</i>
Leishmaniose visceral	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>	<i>L. chagasi</i> (syn. <i>L. infantum</i>)

Fonte: Adaptado de Stebut (2014).

A leishmaniose tegumentar pode apresentar três manifestações clínicas no paciente acometido: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) (WHO 2014). As formas que produzem lesões cutâneas, ulcerosas ou não, úmidas ou secas, porém limitadas são denominadas de LC (Boaventura et al., 2006); Formas que se complicam frequentemente, com o aparecimento de lesões destrutivas e mutilantes nas mucosas do nariz, boca e faringe, oriundas de metástases de lesão inicial cutânea e, associadas à infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (VIANNA, 1911), são designadas como LM, que pode ocorrer meses ou anos após remissão ou cura da lesão inicial cutânea, ou em alguns casos se apresentar em concomitância. Por último, existem formas cutâneas disseminadas, que ocorrem em indivíduos anérgicos com deficiente resposta imune

celular, conhecidas como leishmaniose cutânea difusa (LCD) (MARTINEZ *et al.*, 2002).

A LC é a forma clínica mais encontrada, ocorrendo em cerca de 90% dos pacientes diagnosticados com a doença tegumentar. Normalmente, a doença se manifesta em partes mais expostas do corpo, como face, braços e pernas. Apresenta-se como um nódulo no local da picada que evolui formando uma úlcera granulosa contornada por uma borda elevada. Normalmente, a lesão é única, mas nódulos satélites podem ocorrer nas proximidades da lesão inicial. Quando as úlceras são curadas, deixam cicatrizes permanentes (STEBUT, 2014).

A LM ocorre em diversos países no mundo e, normalmente, manifestam-se como lesões de caráter infiltrante que podem ocasionar destruição parcial ou total da mucosa da cavidade do nariz, boca, faringe, laringe e traqueia. Esta manifestação da doença pode gerar uma elevada reclusão social, uma vez que gera uma grande deformidade física no local da lesão (WHO, 2015).

Já a LCD é uma forma da doença na qual as lesões apresentam-se como nódulos, de forma anérgica e que raramente ulceram. As lesões espalham-se por todo o corpo e este quadro pode estar relacionado à ineficiência ou ausência de resposta celular por parte do sistema imune do hospedeiro (DESJEUX, 2004). A LCD, embora rara, não apresenta cura espontânea. Devido às frequentes recidivas, tornou-se um grave problema de Saúde Pública, pois os pacientes apresentam lesões desfigurantes e incapacitantes, excluindo-os do seu meio de vida social (DESJEUX, 2004).

A forma clínica da leishmaniose na qual ocorre a visceralização do parasito é conhecida por leishmaniose visceral (LV) ou calazar, uma enfermidade de evolução crônica, caracterizada por febre irregular, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia e estado de debilidade progressivo, que pode levar o paciente à morte se este não for submetido ao tratamento específico (WHO/TDR, 2007; ASHFORD, 2000).

2.4 Tratamento das leishmanioses

Atualmente, existem duas formulações de antimoniais pentavalentes disponíveis no mercado: o antimoniato de meglumina, produzido com o nome comercial de Glucantime® e

o estibogluconato de sódio, produzido com o nome comercial de Pentostan®. No Brasil, o medicamento utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose, é o antimoniato de metilglucamina (BALASEGARAM *et al.*, 2012).

Durante o tratamento com os pentavalentes podem ocorrer um ou mais dos seguintes efeitos adversos, tais como artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (IRA). Os eventos adversos são geralmente leves ou moderados e raramente exigem a suspensão do tratamento. Porém em altas doses, o antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade, levando a alterações cardíacas, hepáticas, pancreáticas ou renais que indiquem modificação ou interrupção do tratamento. O efeito adverso mais grave do uso dos antimoniais pentavalentes é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Este efeito é dose e tempo-dependente, e para monitorização desse efeito adverso, recomenda-se realizar eletrocardiograma semanal e uma cuidadosa ausculta cardíaca diária, com o objetivo de detectar arritmias. Caso isso ocorra, o paciente deve ser avaliado criteriosamente e, se necessário, o medicamento deverá ser suspenso e indicado um medicamento de segunda escolha (GROGL *et al.*, 1991; TAVARES *et al.*, 2003).

Não se recomenda o uso dos antimoniais pentavalentes como primeira escolha em pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias, hipersensibilidade aos componentes da medicação, e por serem drogas potencialmente arritmogênicas, são contraindicados em pacientes que fazem uso de beta-bloqueadores e drogas antiarrítmicas (FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

A anfotericina B é droga antileishmanial de segunda escolha com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular. Em hamsters e macacos infectados com *L. donovani*, a anfotericina B foi 400 vezes mais potente que o antimonial pentavalente. No Brasil, o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal (AmBisome™) estão disponíveis para o tratamento da LT. Entretanto, têm como desvantagem o elevado custo e a necessidade de ser administrado em ambiente hospitalar (BALASEGARAM *et al.*, 2012).

Os efeitos adversos mais frequentes são febre, cefaleia, tremores, cianose, hipotensão,

hipomagnesemia, distúrbio de comportamento, calafrios, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão. A presença dos sintomas descritos não contraindica o uso da droga, mas indica um correto manejo na administração do medicamento. Outros efeitos adversos importantes são anorexia, comprometimento da função renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (AMATO *et al.*, 2011).

Este medicamento é contraindicado em pacientes com insuficiência renal e em pacientes que tenham demonstrado hipersensibilidade. E poderá ser empregado durante a gravidez com cuidado e somente se os prováveis benefícios a serem obtidos com a medicação prevalecerem sobre os potenciais riscos envolvidos ao feto. Este medicamento não deve ser utilizado por mulheres grávidas e lactantes sem orientação médica (BRASIL, 2000).

A dificuldade no transporte até os centros de saúde especializados para a administração intramuscular ou endovenosa dos medicamentos, o período relativamente longo de tratamento (até 40 dias) e a via de administração dolorosa, acabam por dificultar a adesão dos pacientes ao tratamento, podendo levar à resistência dos parasitos aos fármacos utilizados (AMATO *et al.*, 2000).

A LT é tratada de acordo com a gravidade da lesão, da espécie etiológica causadora e da possível evolução da doença para as formas mucosa e disseminada, entretanto, para lesões mais simples, deve-se usar aplicação local de pomadas à base de paramomicina ou de antimoniais pentavalentes. A combinação de medicamentos tem apresentado algumas vantagens para o tratamento das leishmanioses, tais como a redução no período de tratamento, a diminuição da concentração do medicamento administrado e dos efeitos tóxicos gerados, um custo mais acessível, o aumento na adesão dos pacientes e uma menor probabilidade do parasito tornar-se resistente (WHO, 2010).

2.5 Medidas de prevenção e controle

As medidas de prevenção e controle do parasito constituem-se importantes, pelas dificuldades intrínsecas do tratamento das leishmanioses e pelo aumento considerável dos números de casos de recidiva da doença. As práticas profiláticas visam geralmente à interrupção do ciclo biológico dos parasitos, entretanto, sua natureza zoonótica, o número

diversificado de espécies de *Leishmania spp.* e a manutenção do ciclo silvestre; dificultam a adoção de ações eficazes de controle e prevenção (TESH, 1995).

Em ambientes domésticos e peridomésticos, o combate ao inseto vetor pode ser realizado através do uso de inseticidas, porém, sua utilização apresenta êxito reduzido em áreas abertas (TESH, 1995). A eficácia depende da classe de inseticida utilizada, da susceptibilidade do inseto vetor, do tipo de superfície ao qual o mesmo é aplicado e da dosagem e método de aplicação (WHO, 2010). No Brasil, os produtos mais utilizados são as cipermetrinas e deltametrinas, pertencentes à classe dos piretroides, os quais apresentam eficácia durante três meses após sua aplicação (BRASIL, 2006).

As estratégias de prevenção dirigidas à população humana concentram-se na detecção dos casos, no diagnóstico preciso e no tratamento efetivo dos doentes, acompanhada de medidas de prevenção à reinfecção, como o uso de repelentes individuais e telas de proteção nas casas. Tais medidas podem reduzir a transmissão da doença, mas não geram um impacto significativo no número de casos da doença (GRIMALDI & TESH, 1993).

Quanto às ações dirigidas ao reservatório, o Ministério da Saúde recomenda o controle da população canina, já que o cão é considerado uma fonte de infecção para o vetor transmissor, comportando-se como elo da infecção entre o vetor e o homem. A eliminação de cães infectados constitui-se em uma medida profilática adotada pelos órgãos de Saúde competentes, embora não seja efetiva para a redução do número de casos da doença (TESH, 1995; GONTIJO & MELO, 2004). A utilização de inseticidas tópicos ou impregnados em coleiras e a vacinação podem funcionar como estratégias preventivas com algum impacto no controle da LVC (WERNECK, 2014). Em relação aos hospedeiros selvagens, a eliminação não é uma medida executável ou ecologicamente correta. Além disso, existe a possibilidade de adaptação do parasito a outros reservatórios existentes em ambientes rurais (GRIMALDI & TESH, 1993; GRAMICCIA & GRADONI, 2005).

Diante de tantas questões a serem analisadas e ainda a desvendar, é condição imprescindível que as ações de manejo ambiental, controle químico e de reservatórios sejam realizadas de forma integrada, produzindo resultados melhores e mais duradouros. Neste contexto, investimentos em programas de saneamento, educação social e conscientização ambiental são de grande valia no controle das leishmanioses (WERNECK,

2014).

Em virtude do prejuízo relacionado às condições de tratamento, à problemas na sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos e às dificuldades encontradas na efetivação dos métodos profiláticos, o desenvolvimento de vacinas, como nova medida profilática, torna-se uma ferramenta vantajosa e com melhor custo-benefício para o controle efetivo e prevenção das leishmanioses, embora ainda seja uma tarefa complexa. (GRIMALDI & TESH, 1993; GONZALO *et al.*, 2002; SUKUMARAN *et al.*, 2003; RAMIRO *et al.*, 2003; DESJEUX, 2004).

2.6 Resposta imune na leishmaniose tegumentar

Os estudos utilizando camundongos são os mais usados para a investigação da eficácia de antígenos vacinais e de novos medicamentos contra as leishmanioses, e a resistência ou a susceptibilidade destes camundongos à infecção deve-se principalmente a fatores genéticos desses animais. O controle da infecção por hospedeiros mamíferos é mediado via imunidade inata (macrófagos, células dendríticas e neutrófilos) e adaptativa (células T), sendo que as citocinas são as principais moléculas relacionadas a uma rede de interações que induz e controla a resposta imune (KEDZIERSKI & EVANS, 2014).

Trabalhos científicos sobre leishmanioses utilizando camundongos deram origem ao modelo Th1/Th2 de resistência e susceptibilidade associado à infecção celular. (KEDZIERSKI & EVANS, 2014). Elevadas concentrações de citocinas TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13, normalmente, encontram-se relacionadas à supressão da resposta imune Th1, direcionando para o desenvolvimento de uma resposta Th2 e à susceptibilidade do hospedeiro à infecção (WILSON *et al.*, 2005). Entretanto, baixas concentrações de IL-4 melhoram a proteção induzida por uma vacina, aumentando indiretamente a produção de IFN- γ por LT CD8⁺ e impedindo uma exacerbação da infecção por *L. donovani* (STAGER *et al.*, 2003).

A importância do desenvolvimento de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 e linfócitos T CD8⁺ no balanço entre as linhagens celulares Th1/Th2 foi demonstrada em modelos murinos infectados com *L. major* (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Os estudos evidenciaram a

associação entre a resistência à infecção por tal espécie com o desenvolvimento de uma resposta Th1, pela produção elevada de IFN- γ e IL-12. Já a susceptibilidade foi associada com o desenvolvimento de uma resposta Th2, mediada pela produção de citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β (SCOTT, 2003).

As células T CD4⁺ são consideradas primordiais na resposta às leishmanioses e quando diferenciadas em células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias que possuem um papel importante na resposta protetora durante a infecção. Já as células T CD8⁺ também são responsáveis por um importante papel na resposta protetora, contribuindo principalmente na geração de uma resposta imune de memória (STAGER *et al.*, 2000).

Sobre a resposta humoral, verifica-se uma tendência para o perfil de resistência quando há uma elevação na produção de anticorpos do isotipo IgG2a; enquanto que a progressão da doença se relaciona com o predomínio de anticorpos do isotipo IgG1 específicos aos antígenos dos parasitos (MARTINS *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014).

2.7 Desenvolvimento de vacinas

As vacinas têm como objetivo estimular o desenvolvimento e manutenção de uma resposta imune protetora e duradoura, capaz de prevenir infecções e/ou reduzir a severidade das doenças (KAECH *et al.*, 2002). E se tratando de leishmaniose, o desenvolvimento de uma vacina pode representar um dos meios mais econômicos para o controle dessa doença (GILLESPIE *et al.*, 2016).

Entretanto, alguns entraves 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).

Não há até o presente momento, 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. Esses 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 a utilização de 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 (NAGILL; KAUR, 2011; SRIVASTAVA *et al.*, 2016). As vacinas que utilizam parasitos atenuados ou mortos, conhecidas como vacinas de 1° geração, podem ser obtidas por meio de culturas *in vitro* com meios modificados, alterações de temperatura, irradiação gama ou mutações genéticas (FOROUGHI-PARVAR & HATAM, 2014). A presença deste parasito permite que o sistema imune do hospedeiro monte uma resposta específica contra os antígenos e que células efetoras e de memória geradas venham conferir proteção. Uma das preocupações com a utilização desta vacina é a possível reversão da virulência dos parasitos, particularmente, em indivíduos imunossuprimidos, entretanto, uma alternativa para a resolução deste problema seria a eliminação destes genes de virulência, permitindo que tais candidatos vacinais ainda sejam estudados (KUMAR & ENGWERDA, 2014).

As vacinas elaboradas a partir de proteínas recombinantes e/ou purificadas de *Leishmania*, ditas como vacinas de 2° geração (DUARTE *et al.*, 2016; JAIN; JAIN, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2016) são uma alternativa vacinal. Como exemplos desse grupo, temos a Leishmune[®], 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[®], 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[®] (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- γ 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 cão 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).

Por fim, as vacinas de DNA são também atrativas para compor uma estratégia profilática contra as leishmanioses. Tais vacinas são mais estáveis e têm a vantagem de custo reduzido, facilidade na produção e armazenamento, estabilidade do material, expressão de antígenos relevantes e eficiente indução de uma resposta imune efetora e de memória (HANDMAN, 2001), 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).

O desafio desse tipo de vacina é a otimização 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). Vacinas de DNA contendo genes que expressam a proteína A2 (ZANIN *et al.*, 2007), PPG (SAMANT *et al.*, 2009) ou HbR (GUHA *et al.*, 2013) provaram estimular uma resposta do tipo Th1, com níveis elevados de IFN- γ e reduzida produção de IL-4; resultando na proteção de camundongos e hamsters imunizados contra infecções experimentais com diferentes espécies de *Leishmania*.

Nesse sentido, 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).

2.8 Phage Display

A técnica de *Phage Display* baseia-se na utilização de bacteriófagos geneticamente modificados, que expressam em seu capsídeo viral um peptídeo aleatório, sendo chamados de “mimotopos”, pois são sequências que imitam epítopos de forma estrutural e/ou imunológica (LARRALDE *et al.*, 2007; SZALAI; JENSEN-JAROLIM, 2008). Esses bacteriófagos são vírus de bactérias e, foram descobertos em 1915 pelo patologista britânico Frederick Twort. Em 1917, um microbiologista franco-canadense, chamado Félix d'Hérelle concebeu o termo “bacteriófago”, que significa “comedor de bactéria”, a partir do isolamento de um microrganismo de *Shigella* (D'HERELLE, 2007; SALMOND; FINERAN, 2015).

Anos depois, 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 (SMITH, G., 1985).

Essa técnica utiliza diferentes classes de bacteriófagos (ou fagos), filamentosos ou não. No caso deste trabalho, fagos filamentosos da classe M13, capazes de infectar bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli*, foram utilizados. A partícula de fago é formada por uma fita de DNA simples, envolta por uma capa proteica constituída por cinco proteínas: pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX, conforme ilustrado na figura 3 (BARBAS *et al.*, 2001).

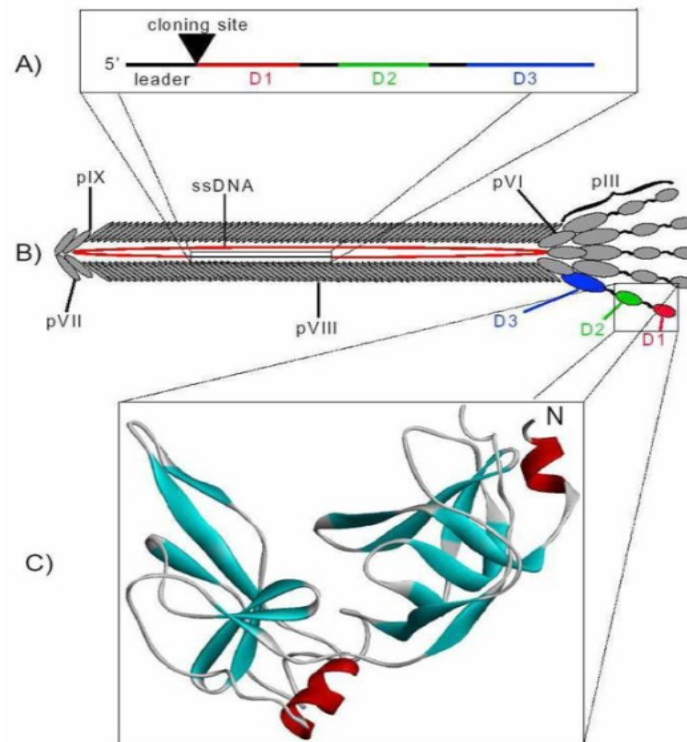


Figura 3 Representação da estrutura de um fago filamentosso. A) Composição do gene III mostrando o sítio de ligação de clonagem para introdução do gene adicional. B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pXI. C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da proteína III (Holliger & Williams, 1999).

Os fagos filamentosos da classe M13, 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 *Phage Display* utiliza o princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de bacteriófagos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou a proteína expressa fique exposta na superfície da partícula viral, fusionada a uma proteína endógena do vírus, como é o caso das proteínas pIII e pVIII (BARBAS, 2001).

A exposição de um peptídeo aleatório na superfície do fago possibilita a sua atuação como um ligante a uma enzima, um imunógeno ou desempenhando qualquer outra atividade em processos biológicos. A inserção de oligonucleotídeos e a subsequente construção de bibliotecas de peptídeos tornam possível a seleção de proteínas com afinidades específicas (MAKOWSKI, 1994). Esta ligação entre o genótipo e fenótipo permite o enriquecimento de

fagos selecionados, por exemplo, usando processos de biosseleção (ou *biopanning*) frente a um determinado alvo.

Dessa forma, fagos que exibem um ligante que seja relevante são retidos em virtude de sua ligação com o alvo, enquanto que os fagos não aderentes são retirados do processo por meio de sucessivas lavagens (BENHAR, 2001). Tal processo de seleção é realizado artificialmente, no qual a molécula alvo é imobilizada em um suporte sólido, geralmente, uma placa de ELISA de fundo chato, entretanto, *beads*, resinas ou membranas podem também serem utilizados.

O fato do fago M13 ter a capacidade de infectar bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*, pela ligação da proteína pIII ao *pillus* F da célula bacteriana, permite a amplificação do número desses clones selecionados utilizando a maquinaria celular das bactérias (BARBAS, 2001). As partículas de fago são processadas no espaço periplasmático da bactéria (BENHAR, 2001), sendo que o gene *lacZ* no bacteriófago permite a distinção entre as colônias bacterianas infectadas com os fagos que carregam sequências exógenas, representadas pela coloração azul, daquelas não-infectadas, que permanecem de cor branca (MESSING, 1983).

A seleção de bacteriófagos recombinantes contendo mimotopos específicos para 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 biosseleção, como demonstrado na figura 4 (PARMLEY; SMITH, 1988).

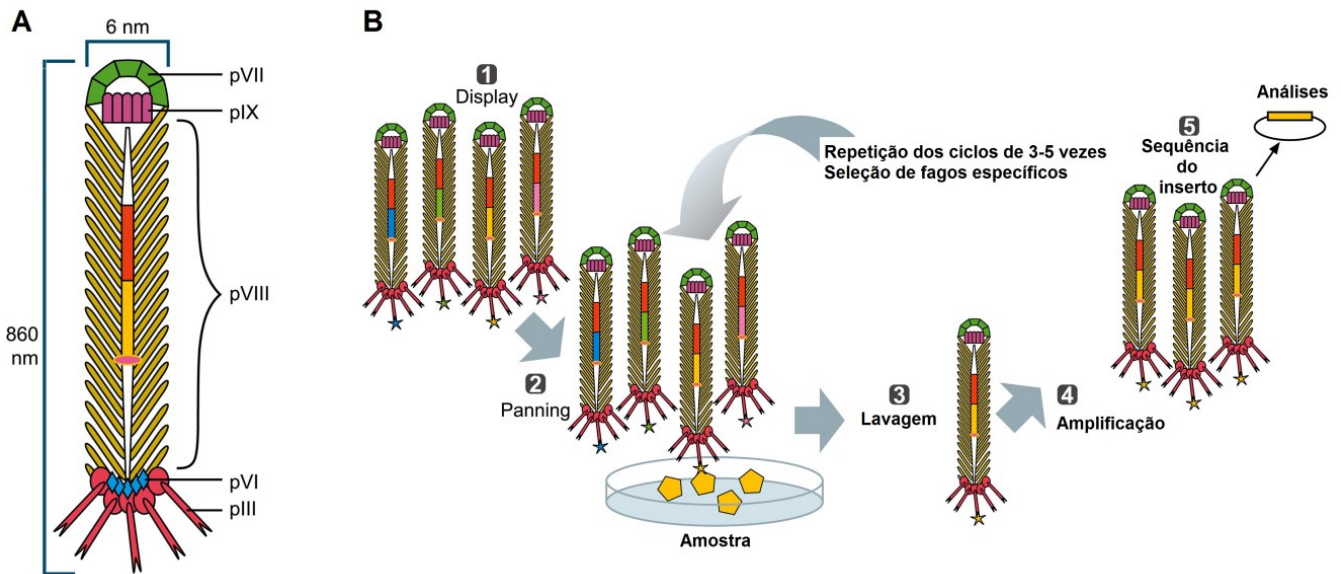


Figura 4 Estrutura do fago filamentosso M13. (A). Ciclo de *Biopanning* (B). Descrição do ciclo: (1) Biblioteca de bacteriófagos geneticamente modificados. (2) *Biopanning*: A biblioteca de fagos que exibe peptídeos ou proteínas distintas (estrelas com cores diferentes) é exposta à amostra-alvo aderida 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).

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).

Em síntese, após sucessivos ciclos 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 alta especificidades podem ser identificadas por sequenciamento e submetidas às análises subsequentes (GAGIC et al., 2016; SMITH, GEORGE P.; PETRENKO, 1997).

O rastreamento 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 na prevenção (COSTA *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2014) da LV canina. 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. amazonensis*, a fim de seu futuro emprego como vacina na LT humana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

⇒ Utilizar a tecnologia de *Phage Display* para identificar novos alvos vacinais para serem avaliados como vacina contra a leishmaniose tegumentar.

3.2 Objetivos específicos

⇒ Selecionar clones de bacteriófagos que expressem, em sua superfície, mimotopos com elevada especificidade e seletividade com anticorpos IgGs de soros de pacientes com LT, por meio de uma abordagem de *Phage Display*.

⇒ Estimular células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com LT antes e após o tratamento, e de indivíduos saudáveis, utilizando os clones selecionados e quantificar os níveis de IFN- γ e IL-4 nos sobrenadantes das culturas, a fim de identificar aqueles capazes de estimular a maior produção de IFN- γ e menores níveis de IL-4.

⇒ Verificar a homologia dos peptídeos exógenos presentes nos clones selecionados frente às sequências primárias de proteínas de *Leishmania*.

⇒ Avaliar o grau de proteção de camundongos BALB/c imunizados com os melhores clones previamente selecionados contra a infecção com *L. amazonensis*, por meio da determinação da carga parasitária no sítio de infecção, linfonodos drenantes, baço, fígado e medula óssea dos animais usando as técnicas de diluição limitante e qPCR.

⇒ Avaliar a resposta celular dos clones antes e após a infecção desafio, por meio da avaliação da produção de IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF por ELISA de captura e citometria de fluxo. Avaliar a ativação macrofágica pela produção de óxido nítrico (NO).

⇒ Avaliar a resposta humoral nos animais antes e após a infecção desafio, pela determinação dos níveis de IgG1 e IgG2a específicos aos imunógenos e parasitos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo

No presente estudo, foi proposta a validação de dois clones de bacteriófagos que apresentaram elevada imunogenicidade em experimentos *in vitro* usando PBMCs humanos.

Primeiramente, foi realizada a seleção de clones de bacteriófagos recombinantes, seguida da avaliação *in vitro* usando PBMCs de pessoas saudáveis e de pacientes com LT frente ao estímulo com os fagos. A predição de epítopos miméticos de *Leishmania amazonensis* por bioinformática e finalmente os ensaios *in vivo* pela imunização de camundongos BALB/c e posterior infecção experimental com *Leishmania amazonensis*. O delineamento do estudo compreende as etapas mostradas na Figura 5.

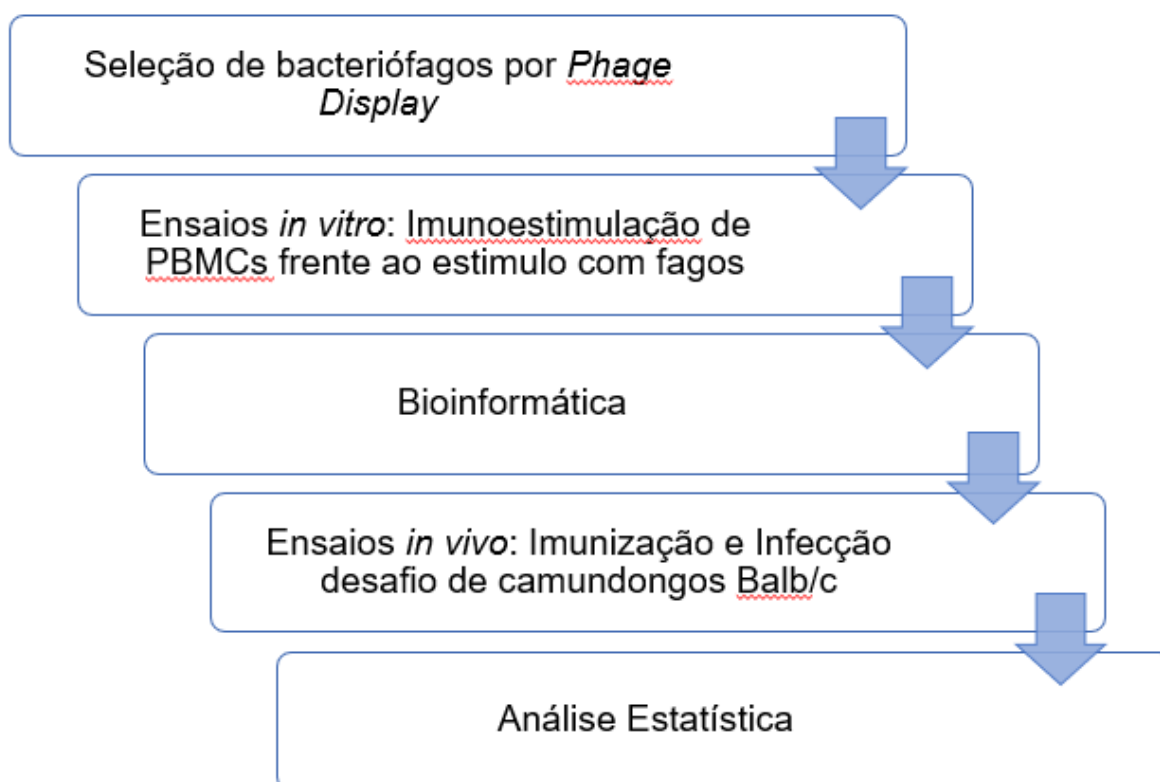


Figura 5 Fluxograma experimental do trabalho

4.2 Animais de experimentação

Camundongos BALB/c fêmeas, de oito semanas de idade, foram utilizados. Os animais foram adquiridos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e mantidos em estante apropriada no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC, UFMG, sob as devidas condições de manejo.

Para o uso do sangue humano, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG (protocolo CAAE-323431.14.9.0000.5149) (ANEXO 1). Para uso do modelo murino, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG (protocolo 225/2017) (ANEXO 2).

4.3 Parasitos

Parasitos da cepa IFLA/BR/1967/PH-8 de *L. amazonensis* foram cultivados em meio de cultura Schneider's (Schneider's Insect Medium, Sigma) completo, constituído por meio Schneider's acrescido com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Sigma), 20 mM de L-glutamina, 200 unidades por mililitro (U/mL) de penicilina e 100 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) de estreptomicina em pH 7,4. Os parasitos foram cultivados a 24°C e repiques das culturas foram efetuados de cinco em cinco dias, período que os parasitos apresentavam-se em fase logarítmica de crescimento. Estoques de parasitos foram mantidos em nitrogênio líquido, a -196°C, conforme descrito por Coelho et al. (2003).

4.4 Preparo do extrato solúvel de *Leishmania amazonensis* (SLA)

O extrato solúvel antigênico (SLA) de *L. amazonensis* foi preparado como descrito previamente por Coelho et al. (2003). Uma estimativa da concentração de proteínas foi avaliada conforme descrito por Bradford (1976).

4.5 Amostras de sangue

Amostras de sangue foram coletadas de indivíduos sadios (n=8, sendo 05 do sexo masculino e 03 do sexo feminino, com idades variando entre 22 e 45 anos) e de pacientes com LT [n=6 com LC, sendo 4 do sexo masculino e 2 do sexo feminino, com idades entre

24 e 56 anos, e n=6 com LM, sendo 5 do sexo masculino e 1 do sexo feminino, com idades entre 33 e 61 anos), residentes em área endêmica da doença (Belo Horizonte). Os indivíduos sadios não apresentaram sinal clínico da doença e mostraram resultados sorológicos negativos usando kit comercial (Teste Kalazar Detect™, InBios International, Seattle, WA, EUA). Os pacientes com LT foram diagnosticados por meio de avaliação clínica, demonstração direta dos parasitos em esfregaços corados por Giemsa e/ou pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar o kDNA de *L. braziliensis*. Tais pacientes foram tratados com antimoniais pentavalentes (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brasil) e a coleta de seu sangue foi realizada em dois períodos: antes e seis meses após a finalização do tratamento, para utilização nos experimentos de imunogenicidade *in vitro* usando culturas de PBMCs.

4.6 Purificação dos anticorpos por acoplamento em microesferas de proteína G

Para os ciclos de *biopanning*, amostras de soro de indivíduos sadios (n=8) e de pacientes com LC (n=6) ou LM (n=6) antes do tratamento foram usadas. As amostras foram preparadas sob a forma de “pools”, cada qual contendo alíquotas individuais e similares de cada soro do grupo para a purificação das IgGs e realização dos ciclos de *biopanning*. A purificação dos anticorpos IgGs dos soros de pacientes com LC ou LM e dos indivíduos sadios foi realizada por meio da incorporação dos anticorpos à microesferas magnéticas (*beads* magnéticos) conjugados à proteína G (Dynabeads, Invitrogen). Para tal, 2×10^9 partículas de microesferas foram lavadas por 3 vezes em tampão MES 0.1 M pH 5.0 e foi adicionado às mesmas 300 μ L do pool de soros dos pacientes ou controles, para um volume final de 500 μ L. A proporção de anticorpos para a quantidade das microesferas em todos os casos foi de 1:1.

Em seguida, foi realizada uma incubação por 40 min sob agitação constante na temperatura ambiente. As microesferas com os anticorpos adsorvidos foram lavadas por 3 vezes em tampão MES 0.1 M pH 5.0, com a finalidade de retirar os anticorpos IgGs não-aderidos. Para a finalização da ligação covalente entre as microesferas e os anticorpos, o sistema *beads*-anticorpos foi lavado 2 vezes com 1 mL de tampão trietanolamina 0.2 M pH 8.2 e ressuspenso em 1 mL de tampão de ligação covalente (20 mM de dimetilpimelidato/HCl em tampão trietanolamina) por 30 min, sob agitação constante. A neutralização da reação foi feita pela incubação do sistema com 1 mL de tampão Tris 50 mM pH 7.5, por 15 min.

Posteriormente, as microesferas incorporadas foram lavadas por 3 vezes em tampão TBS-T 0.1% de Tween 20 e bloqueadas com solução de bloqueio (5% de BSA em TBS-T 0.05% de Tween 20) por 1 h e a 37°C, sendo então ressuspensas em 200 µL de tampão TBS. Para a certificação do acoplamento, 5 µL dos *beads* cobertos pelas IgGs foram incubados por 1 h e a 37°C com o anticorpo anti-IgG humano (diluição de 1:10.000).

Após a incubação, os *beads* foram lavados por três vezes com TBS-Tween 0.1% e a reação foi revelada pela adição do substrato tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida pela adição de 25 µL de ácido sulfúrico 2 N e a leitura da absorbância foi efetuada a 450 nanômetros (nm), em leitor de microplacas de ELISA (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA).

4.7 Ciclos de *Biopanning*

Para a realização dos processos de seleção negativa e positiva, 1×10^{11} partículas virais de uma biblioteca recombinante contendo peptídeos fusionados em fagos filamentosos (biblioteca Ph.d.-C7C, New England, BioLabs®) foram utilizadas. Elas foram diluídas em 190 µL de TBS 1x/Tween 0,1%, para a seleção dos ligantes nas microesferas incorporadas pelos anticorpos IgGs.

O processo foi iniciado pela seleção negativa. No 1º ciclo de *biopanning*, a biblioteca de bacteriófagos recombinantes foi incubada por 30 min com as microesferas acopladas com as IgGs do pool de soros de indivíduos sadios e, em seguida, as mesmas foram precipitadas por atração magnética ao suporte Dynal Biotech (no. 12020), sendo o sobrenadante contendo os clones que não se aderiram aos anticorpos transferido para novo tubo. Tal procedimento foi realizado 3 vezes e apenas os clones de fagos que não se aderiram a tais anticorpos foram recuperados no sobrenadante.

Para a seleção positiva, o sobrenadante coletado anteriormente foi transferido para um novo tubo contendo microesferas acopladas com as IgGs do pool de soros de pacientes com LT, sendo incubadas por 30 min. Tal procedimento foi realizado por 3 vezes, na forma mucosa (n=6) e três vezes na forma cutânea (n=6). As microesferas contendo o sistema *beads*-anticorpos precipitado nos tubos dos *biopanning* das IgGs de pacientes com LT, mais os fagos de interesse aderidos, foram lavadas por 10 vezes com TBS 1x/Tween 20 0,1% e

os fagos selecionados foram então, eluídos em 500 μ L de tampão glicina 0,2 M pH 2,0, sendo tal solução neutralizada pela adição de 75 μ L de Tris-base pH 9,0. As microesferas contendo o sistema *beads*-anticorpos precipitado nos tubos dos biopanning foram processados conforme relatado acima. Os clones de fagos foram recuperados para posterior titulação. Ao final do 3º ciclo de *biopanning*, os clones de fagos foram amplificados e titulados.

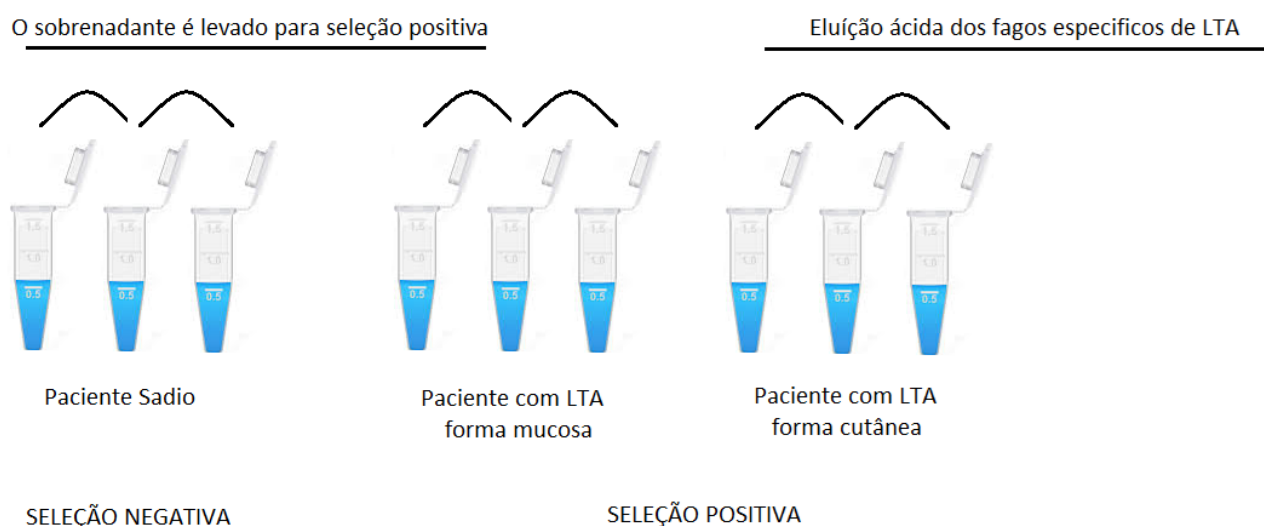


Figura 6 Representação esquemática dos ciclos de *biopanning*

Para a realização das titulações e extração do DNA dos fagos de interesse, os protocolos descritos por Costa et al. (2014) (23) e Salles et al. (2017) (24) foram utilizados e são detalhados a seguir:

4.8 Titulações dos clones de fagos

Para as titulações dos clones de fagos recuperados, os mesmos foram submetidos a diluições seriadas exponenciais (log10) em meio Luria-Bertani (LB) líquido acrescido de ampicilina (100 mg/mL), sendo as diluições de 10^{-1} até 10^{-4} para os eluatos não-amplificados e de 10^{-8} a 10^{-11} para os eluatos amplificados. A cada diluição, 200 μ L da cultura de *E. coli* ER2738 na fase *mid-log* (DO_{600nm} de 0,5) foram acrescentados. Após a infecção das bactérias pelos fagos, a cultura foi transferida para novos tubos contendo 3 mL de ágar Top (10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 7 g de agarose, 1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, por 1 L de água deionizada) e espalhadas em placa de Petri

contendo meio LB sólido acrescido de IPTG (0.5 mM)/Xgal (40 µg/mL) e ampicilina.

Para cada titulação, uma placa de cultura foi confeccionada. As placas foram incubadas à 37°C por 16 h. Após o período de incubação, as colônias que se apresentavam azuis e individualizadas foram quantificadas manualmente. Para estimar os valores dos títulos, o número total de colônias contadas foi multiplicado pelo fator de diluição de cada placa.

4.9 Amplificação e extração do DNA dos fagos de interesse

As colônias de cor azul, individualizadas, presentes nas placas de cultura obtidas quando da titulação 3º ciclo de *biopanning*, foram coletadas para a extração do DNA. Para a amplificação dos fagos, 1.2 mL da cultura de células *E. coli* ER2738 em fase *early-log* ($OD_{600nm} \sim 0,3$) foram distribuídos em cada poço de uma placa *deepwell*. Com palitos de dente estéreis, 96 colônias azuis foram retiradas da placa de Petri e transferidas para a placa de cultura. A cada poço, apenas uma colônia de fago foi adicionada, totalizando 96 colônias em cada *Deepwell*.

A placa foi vedada e incubada por 5 h, sob agitação constante e a 37°C. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 20 min a 2.250 x rpm, sendo o sobrenadante transferido para outra placa. A essa 2ª placa, foi adicionado PEG/NaCl (1/6 do volume total do sobrenadante), sendo a mesma incubada por 14 h e a 4°C. Após, a placa foi centrifugada por 1 h, o sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspenso em tampão iodeto (10 mM de Tris HCl pH 8.0, 1 mM de EDTA e 4 M de NaI). As placas foram agitadas vigorosamente e, em seguida, adicionou-se etanol absoluto. Após uma incubação de 10 min, as placas foram centrifugadas (2.250 x rpm a 4°C e por 10 min), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado contendo o DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70% e, novamente, centrifugado. Finalmente, o DNA foi diluído em 20 µL de água ultrapura e sua qualidade foi avaliada após uma corrida eletroforética realizada em gel de agarose 0.8%, corado com uma solução de brometo de etídio (10 µg/mL).

4.10 Sequenciamento dos clones de fagos selecionados

A reação de sequenciamento utilizando o DNA dos fagos de interesse foi realizada com 500 ng de DNA de cada fago selecionado, 5 pmol do *primer* 96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'-Biolabs) e o *pré-mix* (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit-Amersham

Biosciences).

A reação de 35 ciclos ocorreu em um termociclador de placas, nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 20 seg, anelamento a 58°C por 15 seg e extensão a 60°C por 60 seg. Os *amplicons* gerados da reação de sequenciamento foram precipitados com 1 µL de acetato de amônio e 27.5 µL de etanol absoluto. A placa foi centrifugada por 45 min a 2.500 x rpm e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 150 µL de etanol 70% ao pellet e o material foi centrifugando novamente por 10 min e a 2.500 x rpm, sendo o sobrenadante descartado. A placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi centrifugada a 500 x rpm durante 1 min. Em seguida, a placa foi coberta com papel alumínio, permanecendo assim por 5 min, para a evaporação completa do etanol remanescente. O precipitado foi ressuspendido em tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit-Amersham Biosciences) e o sequenciamento foi realizado no sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

4.11 Análise por bioinformática

A dedução *in silico* das sequências de nucleotídeos do DNA dos fagos de interesse para a identificação dos peptídeos exógenos foi realizada pelo programa Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Após detectar manualmente a posição do inserto, as sequências nucleotídicas são submetidas à tradução pelo servidor online. As sequências válidas foram utilizadas para as análises de similaridades com o alinhamento dos peptídeos selecionados realizado no servidor online do European Bioinformatics Institute (EBI) por meio do programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

4.12 Definição dos alvos vacinais

Os clones de fagos que tiveram as sequências de aminoácidos de seus peptídeos exógenos identificadas foram usados para estimular PBMCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com LM, antes e após o tratamento, a fim de se dosar as citocinas IFN- γ e IL-4 nos sobrenadantes das culturas. Para tal, células foram purificadas por meio de gradiente Ficoll-Hypaque (GE HeaLTcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia) e cultivadas em meio RPMI1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina,

200 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sódio e aminoácido não essencial. PBMCs foram incubadas apenas em meio (controle) ou estimuladas com os clones de fagos individuais (10^{10} fagos, cada), durante 5 dias a 37°C e em 5% de CO₂.

Então, os sobrenadantes foram coletados e os níveis de IFN-γ e IL-4 foram quantificados por ELISA de captura, usando kits comerciais (BD Biosciences, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Dois clones que apresentaram maiores valores de IFN-γ e menores níveis de IL-4 foram selecionados para os experimentos *in vivo*. A seguir, o sequenciamento de aminoácidos dos fagos mais promissores, A4 e A8 (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências aminoácidos válidas dos fagos mais promissores para formulação de uma vacina contra a Leishmaniose Tegumentar.

Clone	Sequência de aminoácidos
A4	YLLCISP
A8	GSRCYPR

4.13 Imunização de camundongos BALB/c

Camundongos BALB/c fêmeas (n=16 por grupo) foram imunizados individualmente, no coxim plantar direito de acordo com seu respectivo grupo: clones A4 e A8, além dos controles: clone selvagem, clone irrelevante e salina (controle de infecção). Três doses (com 10^{10} fagos) foram administradas, em intervalos de 15 dias, em um volume final de 20 µL por animal. Os animais foram divididos em cinco grupos:

Grupo 1: Grupo controle da infecção: Inoculado com salina PBS 1x (salina);

Grupo 2: Grupo controle do fago: Imunizado com clone selvagem: 10^{10} fagos em PBS 1x;

Grupo 3: Grupo controle do peptídeo: Imunizado com clone irrelevante (RP): 10^{10} fagos em PBS 1x;

Grupo 4: Grupo imunizado com clone A4: 1×10^{10} fagos em PBS 1x;

Grupo 5: Grupo imunizado com clone A8: 1×10^{10} fagos em PBS 1x.

As concentrações dos imunógenos foram determinadas com base em experimentos

vacinais padronizados por nosso grupo de pesquisa.

4.14 Infecção desafio

As infecções desafio foram realizadas 30 dias após a última dose da vacina (Fig. 7), quando também ocorreu a eutanásia de metade do número dos animais ($n=8$) de cada grupo para a realização de experimentos de imunogenicidade. Para a infecção, 10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* foram utilizadas. Os parasitos foram inoculados por via subcutânea no coxim plantar direito dos animais em um volume final 20 μL e diluídos em PBS 1x pH 7,4. Os camundongos infectados foram monitorados durante 10 semanas após o desafio e então eutanasiados para realização dos experimentos de imunogenicidade e determinação da carga parasitária. Os animais desafiados foram submetidos à medição da lesão causada na pata infectada semanalmente, durante essas 10 semanas, com auxílio de um paquímetro digital (L.S. Starrett S.A., SP, Brasil).

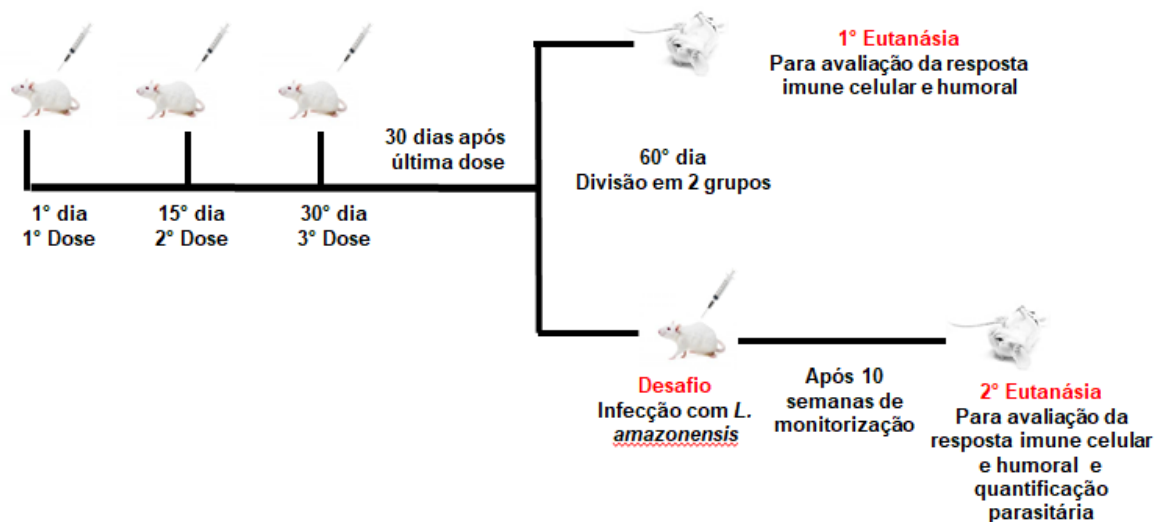


Figura 7 Ilustração da imunização/infecção desafio e eutanásia de camundongos BALB/c.

4.15 Evolução do tamanho da lesão e avaliação da carga parasitária

Medições semanais do diâmetro das patas infectadas foram realizadas com uso de um paquímetro digital. A carga parasitária foi avaliada entre 10 semanas após a infecção desafio. Para tal, a técnica da diluição limitante foi utilizada em fragmentos da lesão da pata, no baço, fígado, linfonodo poplíteo e medula óssea dos animais infectados. Os tecidos e órgãos foram coletados, pesados e macerados em meio de Schneider's completo. O protocolo técnico foi realizado conforme descrito por Coelho et al. (2003). O parasitismo nos animais foi também avaliado pela técnica de qPCR nos fragmentos de lesão e baço, de acordo com protocolos descritos por Martins et al. (2017).

4.16 Isolamento e cultura dos esplenócitos

Camundongos imunizados e/ou imunizados e infectados foram submetidos à eutanásia para a coleta do baço, isolamento, cultura e estimulação dos esplenócitos de acordo com Martins et al. (2013), com modificações. Para tal, 10^6 células/mL foram incubadas em meio de cultura RPMI 1640 completo na ausência (controle negativo) ou presença dos estímulos específicos (clones usados na imunização ou SLA, nas concentrações de 10^{10} fagos ou 25 $\mu\text{g/mL}$ de SLA), por 48 h em estufa com 5% de CO_2 e a 37°C ; quando os sobrenadantes foram coletados para a dosagem das citocinas. A avaliação da participação de LTCD4^+ e LTCD8^+ na produção de $\text{IFN-}\gamma$ pelos esplenócitos dos animais imunizados e desafiados foi realizada com a utilização dos anticorpos monoclonais anti-CD4 (GK 1.5), anti-CD8 (53-6.7) ou anti-IL12 (C17.8), como recomendado pelo fabricante (todos da Pharmingen, San Diego, CA, USA).

4.17 Dosagem das citocinas

As citocinas $\text{IFN-}\gamma$, IL-4, IL-10, IL-12p70 e GM-CSF foram avaliadas. A dosagem das citocinas foi realizada através da técnica de ELISA de captura, utilizando-se os kits comerciais BD OptEIA TM Set Mouse $\text{IFN-}\gamma$, IL-4, IL-10, IL-12p70 e GM-CSF [número de catálogo: 555138, 555232, 555167, 555256 e 555252 respectivamente (Pharmingen, San Diego, CA, USA)], seguindo as instruções dos fabricantes.

4.18 Citometria de fluxo

A frequência de células T capazes de produzir IFN- γ , TNF- α ou IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo usando o sistema Cytometric Bead Array (CBA; BD, Pharmingen, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Esplenócitos foram coletados de animais do grupo controle ou vacinados com os fagos e infectados, para o cultivo *in vitro* como descrito por Vieira *et al.* (2012), com algumas modificações. Para isto, o baço dos animais foi retirado e colocado em uma placa de Petri para maceração. Os fragmentos de tecido foram filtrados e as células obtidas foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640. Os esplenócitos foram ressuspendidos com 1×10^6 células por mL e incubados em tubos de polipropileno (Falcon, BD Pharmingen) em 1 mL de meio RPMI 1640. Os tubos foram separados em quatro grupos de acordo com o antígeno utilizado para estímulo. O primeiro grupo de células foi estimulado com 25 $\mu\text{g/mL}$ de SLA; o segundo grupo foi estimulado com 10^{10} fagos e o terceiro grupo foi composto apenas por células em contato com o meio RPMI 1640. Como controle, células foram incubadas com PMA (25 ng/mL) (Phorbol-12-miristato-13-acetato) e ionomicina (1 $\mu\text{g/mL}$) em meio RPMI 1640. Todas as culturas foram deixadas por 48h a 37°C e 5% de CO₂. Após este período de incubação foram adicionados 10 $\mu\text{g/mL}$ de Brefeldina A (BFA, Sigma, St Louis, MO, USA) por tubo e as culturas celulares foram deixadas por mais 4 h nas mesmas condições. Passado o período de incubação, 200 μL de EDTA (Sigma) foram adicionados em cada tubo em uma concentração final de 2 mM. As culturas foram lavadas com tampão FACS (PBS 1x, 0,5% BSA e 0,1% azida sódica), centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI 1640. As células foram separadas e marcadas com FITC anti-CD4 ou anti-CD8 (Caltag, Burlingame, CA, USA) durante 30 min a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a marcação, os esplenócitos foram permeabilizados com um tampão FACS-perm (tampão FACS adicionado de 0,5% de saponina) e incubados com anticorpos contra as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, marcadas com ficoeritrina e deixadas em repouso por 30 min a temperatura ambiente e na ausência de luz.

Após a marcação das citocinas citoplasmáticas, as células foram lavadas com tampão FACS, fixadas com uma solução de fixação FACS-fix (10 g/L de paraformaldeído, 10,2 g/L de cacodilato de sódio e 6.63 g/L de cloreto de sódio, pH 7.2) e armazenadas a 4°C até a leitura. A citometria foi realizada em aparelho FACScalibur® (Becton Dickson - BD, USA) utilizando o pacote de software Cell-Quest™ (Franklin Lakes, NJ, USA), tendo sido baseada

em 30.000 eventos por amostra.

Para avaliar as ligações não específicas, reagentes isotípicos marcados com fluorocromo foram utilizados e a auto-fluorescência foi monitorada pela utilização de um controle negativo (suspensão celular incubada na ausência de anticorpos marcados com fluorocromo, mas na presença dos tampões). A frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺, que expressam as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 foi determinada seguindo uma estratégia de análise convencional. O tamanho (forward laser scatter – FSC) e a granulosidade (Side laser scatter - SSC) para as células de interesse foram definidos e a região R1 foi selecionada para análise. Os gráficos de densidade celular de CD4/FL1 ou CD8/FL1 versus IFN- γ /FL2, TNF- α /FL2 e IL-10/FL2 foram definidos para determinar a porcentagem de IFN- γ , TNF- α e IL-10 presentes no interior de células T. Os resultados foram expressos como indexes, que foram obtidos pela divisão do percentual de células T CD4⁺ ou CD8⁺ nas culturas estimuladas versus estas das culturas não estimuladas (controle).

4.19 Avaliação da resposta humoral pela produção de anticorpos IgG1 e IgG2a

A resposta humoral baseada na presença de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-imunógeno e anti-parasito foi avaliada antes e após a infecção, conforme descrito por Coelho et al. (2003) e Martins et al. (2017). O perfil da resposta humoral nos animais vacinados e/ou desafiados foi avaliado através da produção dos isotipos IgG1 e IgG2a, específicos aos clones de fagos ou ao SLA. Curvas de titulação foram realizadas para determinar a concentração de antígeno e a diluição do anticorpo mais adequado a ser utilizado. Placas de ELISA (Biofil®, Brasil) foram revestidas com SLA (1,0 μ g por poço) em 100 μ L de coating buffer (50 mM tampão carbonato) pH 9,6, durante 18 h e a 4°C. Depois disso, os poços foram bloqueados usando 200 μ L de tampão de TBS-T contendo 5% caseína durante 1 h e a 37°C. As placas foram lavadas 7 vezes usando TBS-T, que foram incubadas com 100 μ L dos soros individuais, durante 1 hora e a 37°C. As amostras foram diluídas (1:100) em TBS-T contendo 0,5% solução de caseína. As placas foram lavadas 7 vezes com TBS-T, e incubadas com os anticorpos específicos de camundongos marcados com peroxidase (Sigma Aldrich), diluídos a 1:5.000, e a incubação ocorreu durante 1 h e a 37°C. Após 7 lavagens com TBS-T, a reação foi revelada através da incubação com H₂O₂, *ortho*-phenylenediamine e tampão de citrato-fosfato pH 5,0, por 30 min e no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 25 μ L de H₂SO₄ 2 N, e a densidade óptica foi lida em um leitor

de microplacas de ELISA, a 492 nm. Em todos os ensaios, controles positivos e negativos foram utilizados.

4.20 Avaliação da carga parasitária

Para realizar a quantificação de parasitos, o tecido infectado, baço, fígado, linfonodo drenante e medula óssea foram removidos após eutanásia dos animais, 10 semanas após a infecção. Os órgãos foram macerados em meio de Schneider's incompleto na proporção de 1 mL de meio de cultura a cada 100 mg de tecido. Diluições seriadas foram realizadas utilizando meio de Schneider's completo, partindo de uma diluição de 10⁻¹ até uma diluição máxima de 10⁻¹². As placas de cultura celular de 96 poços (Nunc) foram incubadas em estufa a 24°C durante 7 dias e os resultados foram representados pela maior diluição na qual os parasitos puderam ser visualizados utilizando um microscópio trinocular invertido (Axiovert 25, Zeiss), de acordo com Coelho et al. (2003).

4.21 Avaliação da carga parasitária dos animais imunizados com fagos e infectados por *L. amazonensis* através da técnica de PCR Real Time

A carga parasitária do baço e da pata infectada foi também avaliada por qPCR. Para isto, o DNA das amostras foram extraídos através do método de fenol-clorofórmio, como descrito por Ferreira et al. (2012), e ressuspendido em 100 µL de água ultrapura. As reações de PCR foram realizadas com 2x SYBR® Green PCR Master Mix, utilizando 5 µL do mix disponibilizado no kit, 2 mM de cada primer (Forward - CCTATTTTACACCAACCCCCAGT e Reverse - GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA) e 20ng de cada DNA. Uma curva padrão foi obtida do DNA extraído de 1x10⁸ parasitos para comparação e análise dos resultados finais. A PCR foi realizada no aparelho StepOne™ (Life Technologies, USA), as amostras foram incubadas a 95°C durante 10 min e sucessivamente foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Durante cada ciclo os sinais de fluorescência foram coletados para análise e após terminada a reação, a quantificação de parasitos de cada amostra foi calculada de acordo com a curva padrão. O experimento foi realizado em duplicata e os resultados expressos como o número de parasitos por DNA total (Fiuza et al., 2015). A comparação da carga parasitária entre os grupos experimentais também foi calculada (em percentual).

4.22 Bioinformática, clonagem e purificação da proteína diidroorotato

Ensaio de bioinformática indicaram a proteína desidrogenase de diidroorotato (XP_003722973.1, PDB: 4WZH_A) como expressando ambos os mimotopos expostos a fago A4 e A8 (YLLCISP e GSRCYPR, respectivamente). 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 (peso molecular e pi) foram previstas usando a ferramenta Compute pI/Mw no servidor Expasy (<http://web.expasy.org/computeipi/>). A hidrofobicidade e a carga líquida dos peptídeos foram previstas usando o servidor de banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/prediction/predictionmain.php>) (Wang et al., 1990). O alinhamento conformacional foi previsto usando o software PepSurf (<http://pepitope.tau.ac.il/>) e as regiões imunogênicas nas estruturas proteicas foram avaliadas usando o servidor Epitopia (<http://epitopia.tau.ac.il/>). Neste contexto, esta proteína foi clonada utilizando o kDNA de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) e a versão recombinante foi expressa na cepa *Escherichia coli* M15 pela adição de 1.0 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG, Promega, Montreal, Canadá) por 2 h e a 37°C. Para purificação, as bactérias foram lisadas, o produto foi centrifugado a 12 000 x rpm durante 30 min a 4°C e a proteína recombinante foi purificada sob condições não desnaturantes utilizando uma coluna His-Trap (GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, PA, EUA) anexado a um sistema FPLC (GE Healthcare Life Science).

A proteína recombinante foi testada em experimentos ELISA utilizando 1,0 μ g por poço em placas de imunoensaio de microtitulação (Jetbiofil[®], Belo Horizonte, Brasil), com o objetivo de confirmar sua reação com soro de camundongos vacinados com os fagos selecionados (A4 e A8). Utilizaram-se amostras de camundongos não vacinados ou vacinados com fago selvagem (WTP, *wild-type phage*) ou com clones irrelevantes (RP, *non-relevant phage*), todos 1:100 diluídos, como controles. Utilizou-se um anticorpo anti-IgG de mouse conjugado à peroxidase (diluição de 1:10.000) e as reações foram desenvolvidas e interrompidas como descrito acima.

4.23 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o GraphPad Prism *software* (versão 6.0 para

Windows) e GraphPad QuickCals (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). O teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni foram utilizados para comparação entre os grupos. Diferenças foram consideradas significativas com $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Seleção dos clones de fagos por *Phage Display*

Inicialmente, ciclos de *biopanning* utilizando anticorpos IgG de indivíduos saudáveis e indivíduos com LT não-tratados foram realizados com o objetivo de selecionar clones expressando peptídeos de interesse (mimotopos) para serem testados como candidatos à vacina contra LT. Após três ciclos de *biopanning*, 58 clones foram pré-selecionados, mas apenas 9 deles exibiram sequências de aminoácidos válidos e não repetidas, e foram usados para estimular PBMCs de humanos. Essas sequências foram deduzidas pelo servidor ExPasy, e um alinhamento não mostrou consenso entre as sequências. Então, os clones foram usados para estimular células de indivíduos sadios e pacientes com LM, antes e após o tratamento, quando a produção de IFN- γ e IL-4 foi avaliada.

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

Nossa estratégia experimental baseou-se em um trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo, no qual mimotopos imunogênicos foram identificados e testados com sucesso contra a LV murina (Ramos et al., 2017). Conforme descrito no estudo anterior, no presente trabalho, a seletividade foi apresentada como a capacidade do clone se ligar ao seu alvo com base na mistura de diferentes moléculas. Os valores foram calculados determinando a razão entre os níveis de IFN- γ e IL-4, que foram obtidos após a estimulação de PBMCs de pacientes com LM, através dos valores obtidos usando o estímulo de fago irrelevante (RP). Uma razão foi calculada e os resultados foram definidos como a seletividade de cada clone.

Por outro lado, a especificidade foi definida como a capacidade do clone de se ligar ao seu alvo com base na presença do peptídeo exibido na superfície do fago. Os valores foram calculados determinando a razão entre os níveis de IFN- γ e IL-4, que foram obtidos após a estimulação de PBMCs de indivíduos saudáveis, através dos valores obtidos usando o

estímulo WTP. Uma razão foi calculada e os resultados foram definidos como a especificidade de cada clone (Fig. 8).

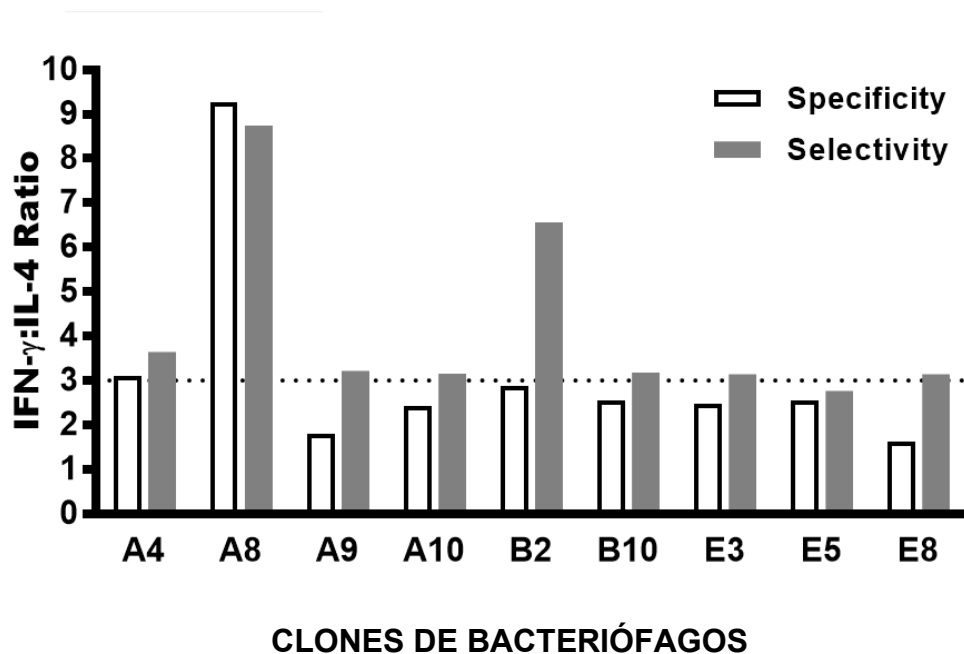


Figura 8 Seletividade e especificidade dos clones de fagos com base na produção específica de IFN- γ e IL-4 por PBMCs. Células foram coletadas de indivíduos com LM e indivíduos saudáveis, e células (107) foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo em placas de cultura de tecidos de fundo plano. As células não-estimuladas (meio) ou estimuladas com cada um dos clone de fago (1010 fagos, cada) ou SLA de *Leishmania amazonensis* (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foram incubadas por 48h a 37°C em 5% de CO₂. Os fagos WTP e RP foram usados como controles (1010 fagos, de cada). Os sobrenadantes foram coletados e os níveis de IFN- γ e IL-4 foram medidos por ELISA de captura (sanduíche). As barras brancas indicam a especificidade de cada clone, e as barras cinza indicam a seletividade. Com os valores absolutos, a razão entre os níveis de IFN- γ e IL-4 foi calculada, e a seletividade do clone foi definida e é mostrada na figura.

Após a análise da seletividade e especificidade dos fagos, os clones A4 e A8 foram selecionados como obtendo razão de IFN- γ /IL-4 maior que 3.0. Dessa forma, tais clones foram utilizados para os experimentos *in vivo* em camundongos BALB/c.

5.3 Imunogenicidade induzida por clones A4 e A8 antes da infecção

Camundongos BALB/c foram imunizados com os clones A4 e A8. Trinta dias após a última dose da vacina, metade dos animais (n=8 de cada grupo) foram eutanasiados e as células do baço foram coletadas. Como controles, os animais foram inoculados com WTP, RP e salina. Os resultados mostraram que animais imunizados com os clones A4 e A8 produziram níveis

elevados de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF, quando comparado com os grupos controle (Fig. 9). Nenhuma produção significativa de IL-4 e IL-10 foi observada nos grupos.

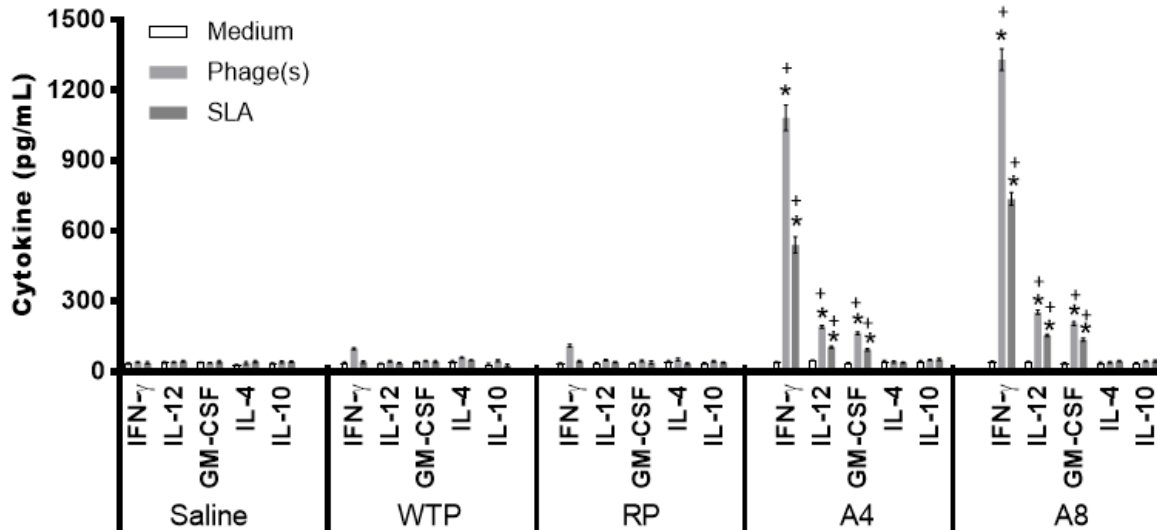


Figura 9 Imunogenicidade induzida em camundongos BALB / c pelos clones de fago A4 e A8. Células de baço foram obtidas de camundongos (n = 8 por grupo) 30 dias após a última imunização. As células (5×10^6) foram estimuladas separadamente com os fagos A4, A8, WTP ou fago irrelevante RP (10^{10} fagos, cada), durante 48 h a 37 em 5% de CO₂. Os níveis de IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram medidos em sobrenadantes de cultura por ELISA. (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina (P < 0,0001). (+) Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos WTP e RP (P < 0,01).

A resposta humoral mostrou maior produção de anticorpos do isotipo IgG2a específicos ao parasito nos camundongos imunizados com os fagos A4 e A8, e uma baixa produção do isotipo IgG1 nestes animais (Fig. 10). A razão entre os valores de IgG2a e IgG1 mostrou valores mais elevados nos camundongos imunizados com A4 e A8, quando comparados com os controles, confirmando, assim, a indução de um perfil imune do tipo Th1 nos animais vacinados com os fagos A4 e A8.

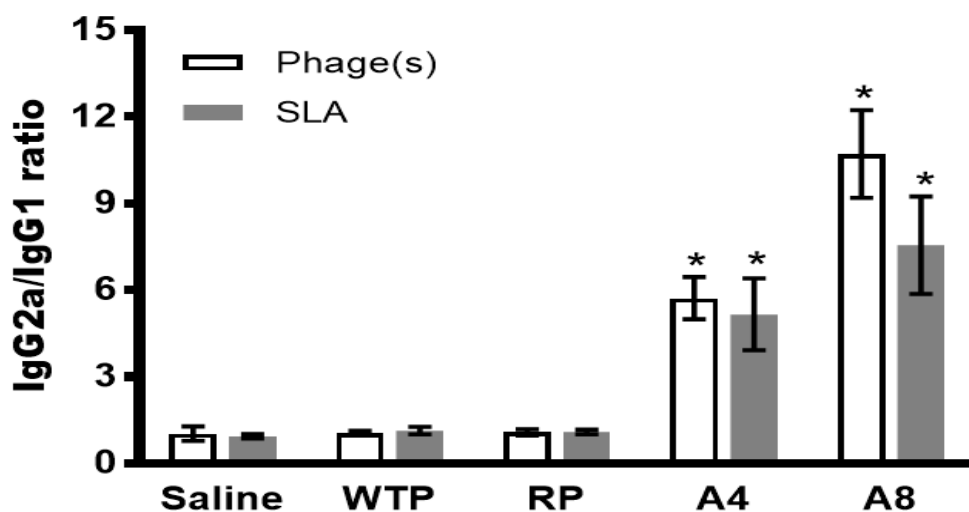


Figura 10 Antigenicidade induzida em camundongos BALB / c pelos clones de fago A4 e A8. Coletaram-se amostras de soro dos animais e determinaram-se os níveis de anticorpos anti-fagos e antiparasitários IgG2a e IgG1, e as razões entre a produção de IgG2a e IgG1 foram calculadas e apresentadas na figura. Em ambos os casos, as barras representam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina ($P < 0,0001$).

5.4 Imunogenicidade induzida por clones A4 e A8 após a infecção

Após a infecção, a imunogenicidade observada foi mantida nos camundongos imunizados com A4 e A8, uma vez que foram encontrados níveis mais elevados de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF específicos aos fagos e parasitos. Em contraste, nos grupos controles, maior produção de IL-4 e IL-10 anti-parasita foi encontrada (Fig. 11).

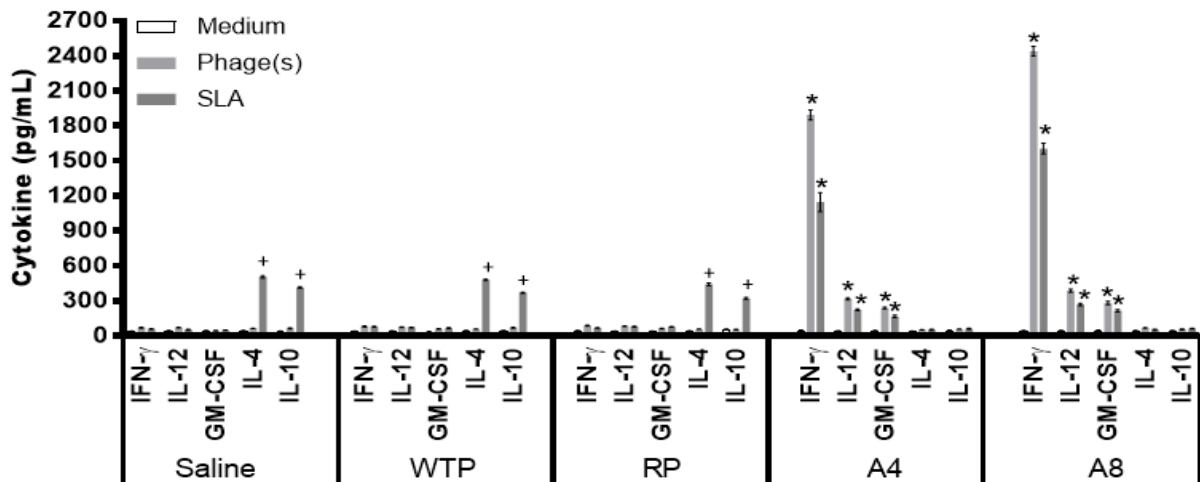


Figura 11. Resposta imune gerada após infecção desafio por *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB / c (n=8 por grupo) previamente imunizados com os imunógenos. Dez semanas após a infecção, os seus baços foram coletados e os esplenócitos (5×10^6) estimulados com A4, A8, WTP ou RP (1×10^{10} moléculas, cada) durante 48 h a 37°C em 5% de CO₂. Os níveis de IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram medidos em sobrenadantes de cultura por ELISA. Barras representam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos salina, WTP e RP (P < 0,0001). (+) Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos A4 e A8 (P < 0,0001).

O perfil de anticorpos foi mantido nos grupos A4 e A8 após o desafio, uma vez que maiores níveis de IgG2a e menor presença de IgG1 anti-fago e anti-parasita foram encontradas, enquanto que nos grupos controle, maiores níveis de IgG1 foram encontrados, corroborando com um perfil de resposta Th2 tipicamente relatada em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. (Fig. 12).

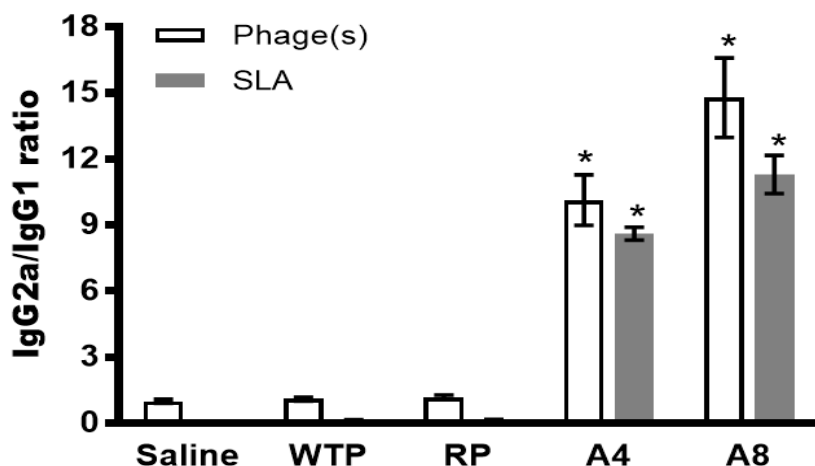


Figura 12 Antigenicidade após infecção desafio por *Leishmania amazonensis* camundongos BALB / c (n=8 por grupo) foram imunizados e posteriormente desafiados com o uso de promastigotas de *L. amazonensis*. Dez semanas após a infecção, foi validada a produção de anticorpos IgG2a e IgG1, e as razões IgG2a / IgG1 foram calculadas. Barras representam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos salina, WTP e RP (P < 0,0001).

Animais imunizados com os clones A4 e A8 e desafiados com *L. amazonensis* produziram níveis significativamente mais elevados de nitrito, em comparação com os controles (Fig. 13), indicando que a presença de IFN- γ possivelmente estimulou a maior produção de óxido nítrico (NO) e outras moléculas antileishmanias, auxiliando no controle do parasito nos animais vacinados e infectados.

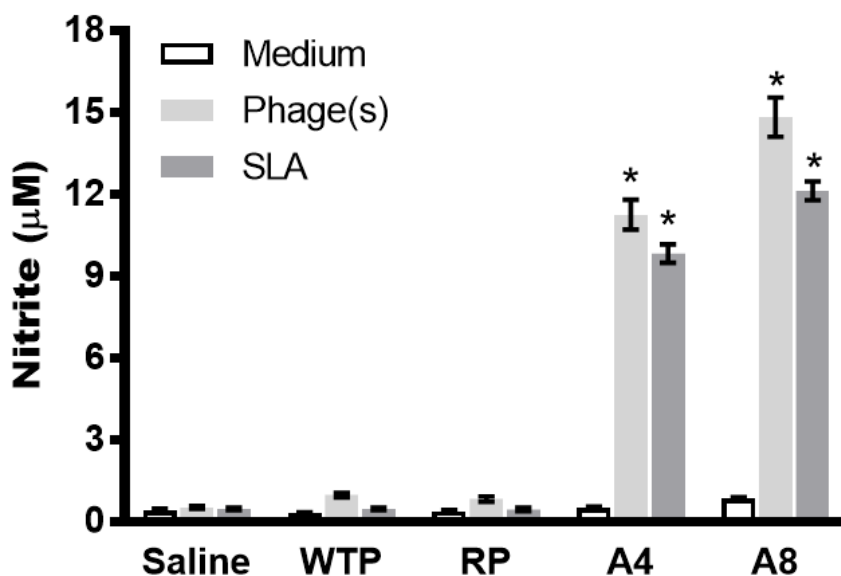


Figura 13 Ativação de macrófagos avaliada pela produção de nitrito. Células de baço de camundongos (n=8 por grupo) que receberam solução salina ou foram imunizadas com fagos WTP, RP, A4 ou A8, e posteriormente infectadas com promastigotas de *Leishmania amazonenses*. A produção de nitrito foi avaliada

em sobrenadantes celulares. Barras representam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos salina, WTP e RP (P <0,0001).

Para caracterizar a origem da produção de IFN- γ nos animais imunizados com os clones A4 e A8, a participação das células T CD4⁺ e CD8⁺ na secreção dessa citocina foi avaliada por meio de um experimento de inibição celular, no qual foram adicionados anticorpos monoclonais direcionados contra as moléculas CD4⁺ e CD8⁺ nas culturas *in vitro*. Em ambos os protocolos de imunização usando os fagos A4 e A8, o envolvimento de células T CD8⁺ na produção de IFN- γ foi significativamente maior, quando comparado com os resultados encontrados usando o anticorpo anti-CD4 (Fig. 14).

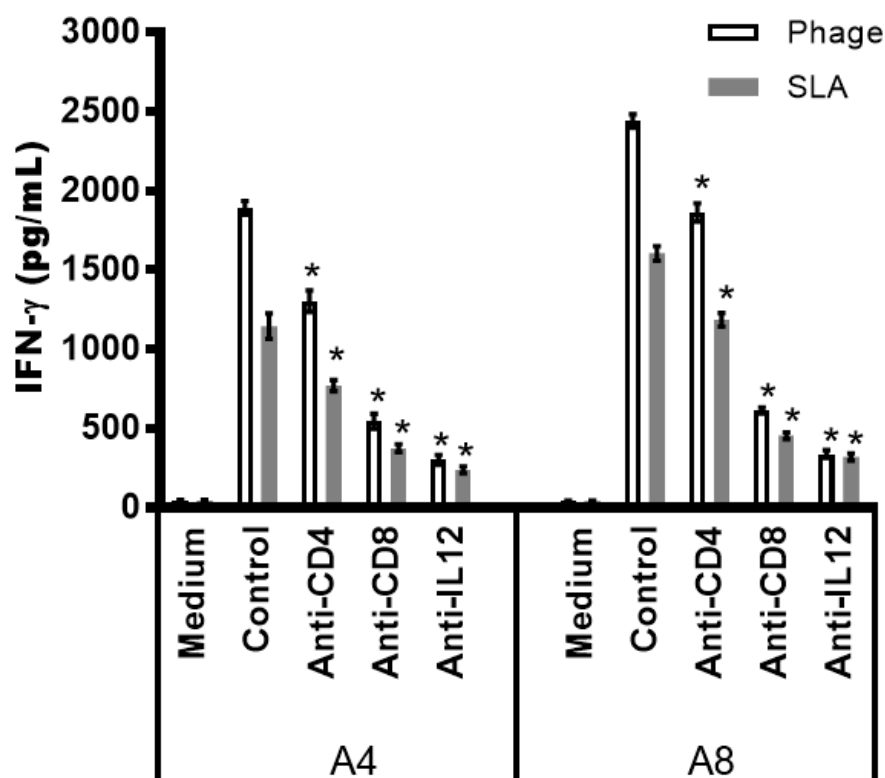


Figura 14 Envolvimento de células T CD4⁺ ou CD8⁺ na produção de IFN- γ em animais infectados e imunizados. Camundongos BALB/c (n=8 por grupo) foram imunizados com os clones A4 e A8 e posteriormente desafiados usando promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Dez semanas após a infecção, as células do baço (5×10^6) não foram estimuladas (controle) ou estimuladas com A4, A8, WTP ou RP (1×10^{10} , cada) na ausência ou presença de mAbs Anti-IL-12, Anti-CD4⁺ ou Anti-CD8⁺ ($5 \mu\text{g/mL}$, cada). Os níveis de IFN- γ nos sobrenadantes das células foram medidos por ELISA. Barras indicam a média \pm desvio padrão dos diferentes estímulos e grupos. (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($P < 0,0001$).

O perfil intracitoplasmático de citocinas foi investigado nas células esplênicas estimuladas, por meio de citometria de fluxo, e os resultados mostraram que a imunização com os clones A4 e A8 induziu níveis elevados de células T expressando IFN- γ , IL-2 e TNF- α , em consonância com baixos de IL-10, quando comparados aos grupos controle (Fig.15).

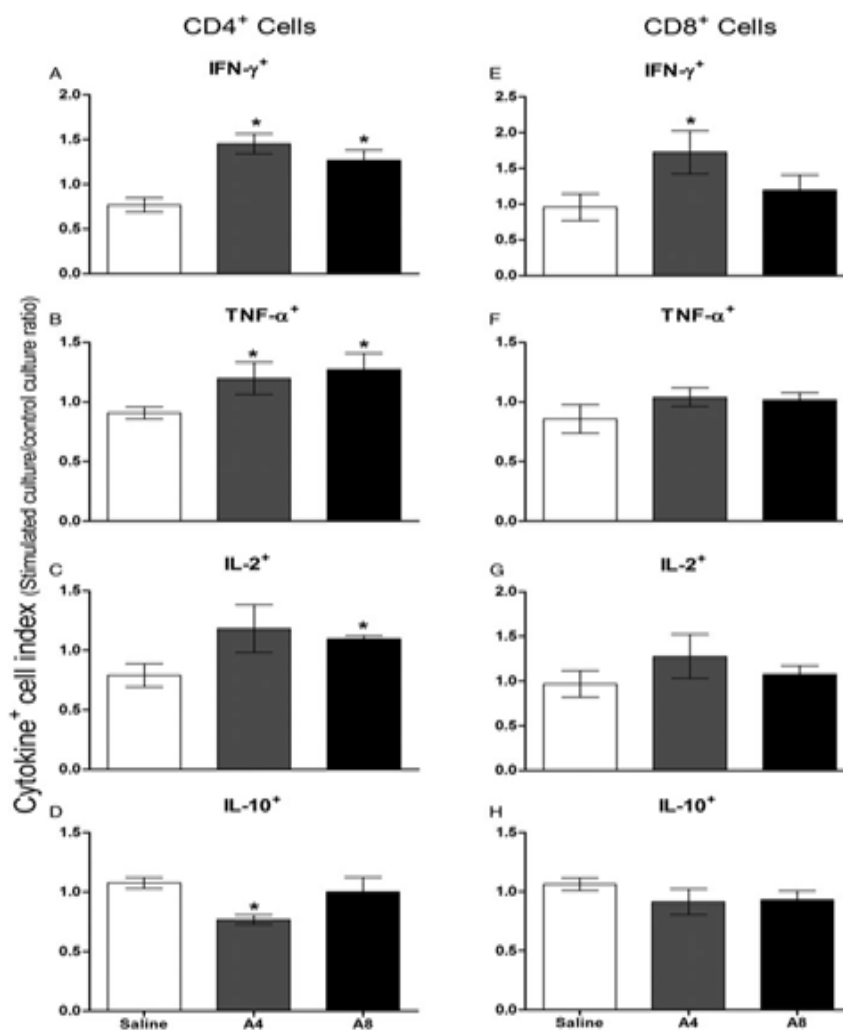


Figura 15 Freqüência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de citocinas intracitoplasmáticas em animais infectados e imunizados. Os camundongos receberam solução salina (barras brancas) ou foram imunizados com clones A4 (barras cinzentas escuras) ou A8 (barras pretas). Em seguida, foram infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* e, 10 semanas depois, os seus esplenócitos foram estimulados *in vitro* com SLA (25 μ g/ mL). Os resultados foram expressos como índices de citocinas para IFN- γ , IL-2, TNF- α e IL-10 em (A), (B), (C) e (D) para células T CD4⁺, e em (E), (F), (G) e (H) para células T CD8⁺. Barras indicam a média mais desvio padrão dos grupos. (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina (P < 0,05).

5.5 Carga Parasitária

O efeito da imunização com os clones A4 e A8 contra a infecção por *L. amazonensis* foi avaliada por três formas, descritas a seguir. Inicialmente, foram realizadas, durante as 10 semanas de monitoramento, medições semanais das lesões desenvolvidas nas patas infectadas dos animais. Os camundongos vacinados com A4 e A8 apresentaram reduções significativas no desenvolvimento da lesão, na ordem de 5,8 e 6,8 milímetros (mm),

respectivamente, quando comparados com o grupo salina; 5,0 e 6,0 mm; respectivamente, quando comparado com o grupo selvagem (WTP) e 5,3 e 6,3 mm, respectivamente, quando comparado com o grupo RP (Fig. 16).

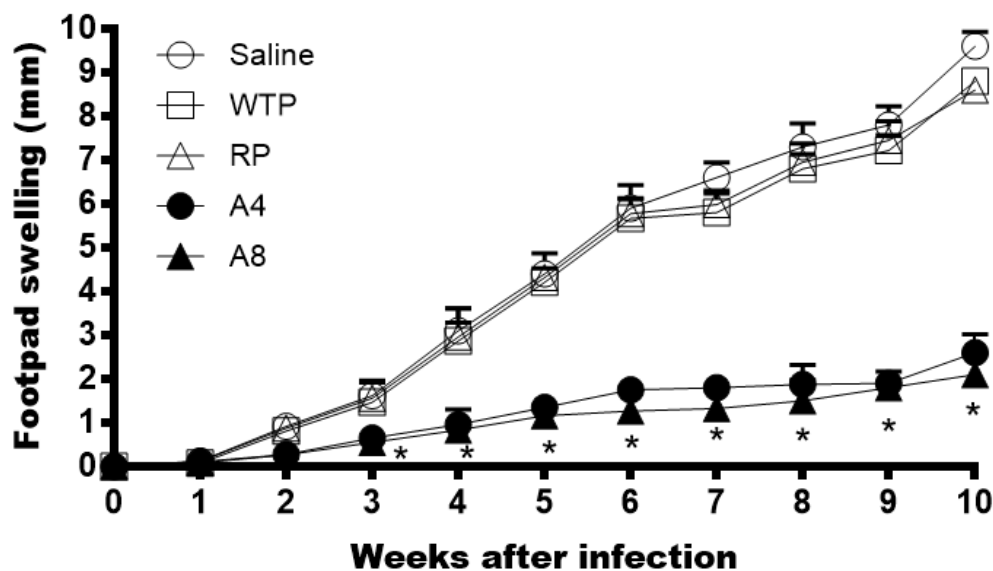


Figura 16 Redução do inchaço da pata infectada. Eficácia protetora contra a infecção por *Leishmania amazonensis* com a imunização usando clones de fago A4 e A8.

Após 10 semanas de monitoramento, após a infecção, os animais foram eutanasiados e o parasitismo foi avaliado na pata infectada e em diferentes órgãos. Usando uma técnica de diluição limitante, camundongos vacinados com A4 e A8 apresentaram reduções significativas na carga parasitária no tecido e órgãos avaliados, quando comparados com os controles (Fig. 17).

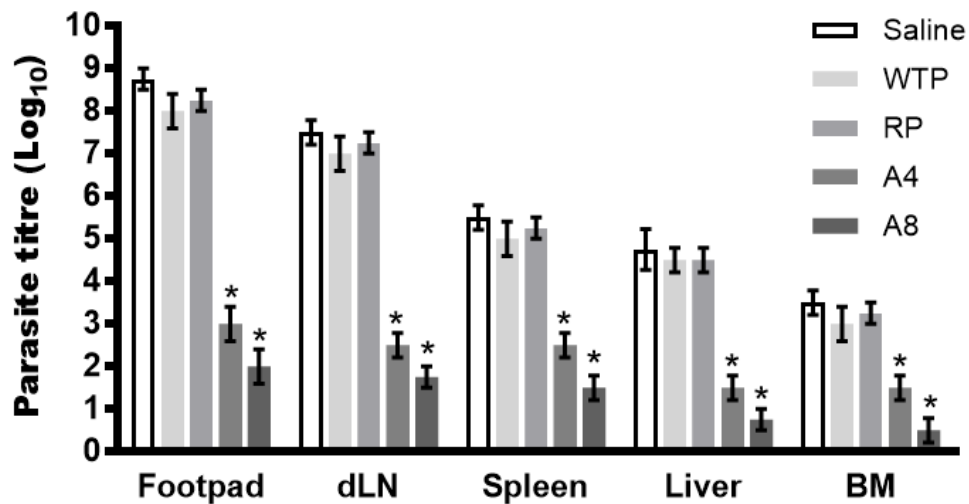


Figura 17 Eficácia protetora contra a infecção por *Leishmania amazonensis* com a imunização usando clones de fago A4 e A8. Por uma técnica de diluição limitante a carga parasitária foi avaliada na pata infectada, fígado, baço, linfonodos drenantes (dLN) e medula óssea (BM) dos animais. Barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos salina, WTP e RP ($P < 0,0001$).

Em paralelo, o parasitismo esplênico avaliado por qPCR mostrou também que a imunização com os clones A4 e A8 induziu redução significativa no parasitismo, quando comparado com os resultados encontrados nos controles (fig. 18). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos A4 e A8.

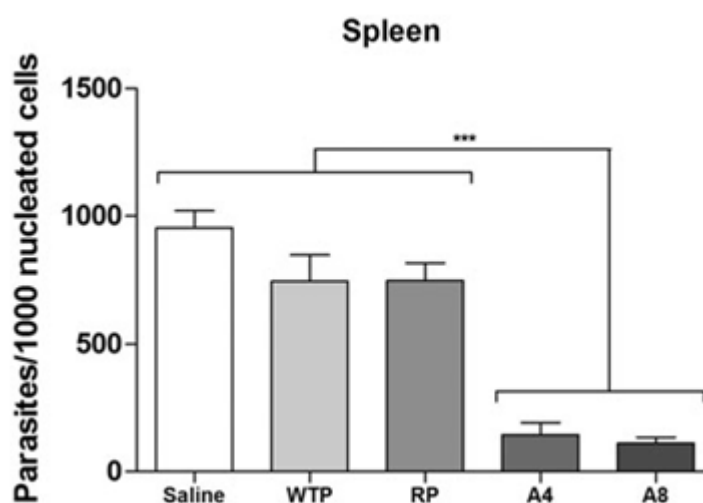


Figura 18 Carga parasitária avaliada pela técnica de RT-PCR. No mesmo período de tempo em que camundongos infectados e imunizados (n = 8 por grupo) foram eutanasiados e a carga parasitária foi avaliada por uma técnica de diluição limitante, seus baços também foram utilizados para avaliar o parasitismo por uma técnica de RT-PCR. Os resultados são apresentados como o número de parasitas por 1000 células nucleadas. Barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (***) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos salina, WTP e RP (P <0,0001).

5.6 Bioinformática e mapeamento dos mimotopos A4 e A8

Ferramentas de bioinformática foram utilizadas para avaliar as propriedades físico-químicas dos fagos selecionados. A tabela 3 resume as características dos peptídeos exógenos constituintes dos fagos A4 e A8.

Tabela 3: Caracterização dos peptídeos miméticos de antígenos de *L. amazonensis* selecionados por *Phage Display*.

CLONE	SEQUÊNCIA	CARGA LÍQUIDA	HIDROFOBICIDADE	PM
A4	YLLCISP	0	50%	1343,6
A8	GSRCYPR	+2	28%	1373,5

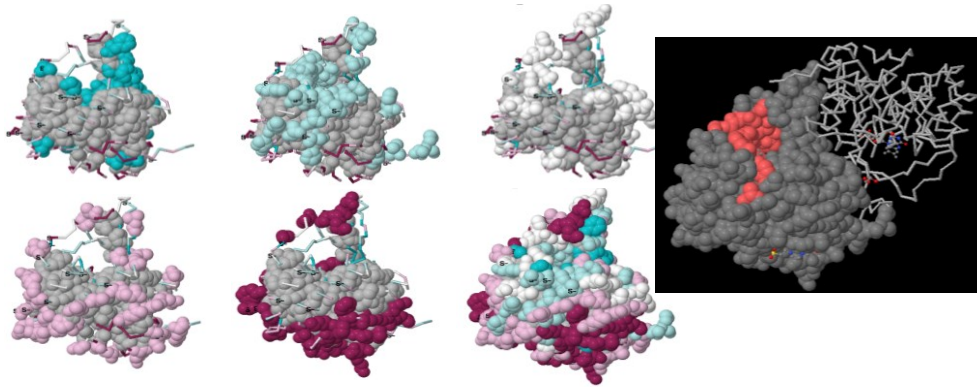
PM: Peso Molecular

Identificamos que os mimotopos presentes nos fagos A4 e A8 estão presentes na sequência de aminoácidos da proteína “diidroorotato desidrogenase”. O peptídeo exposto no fago A4 foi também identificado na sequência da proteína “6-fosfogluconolactonase”,

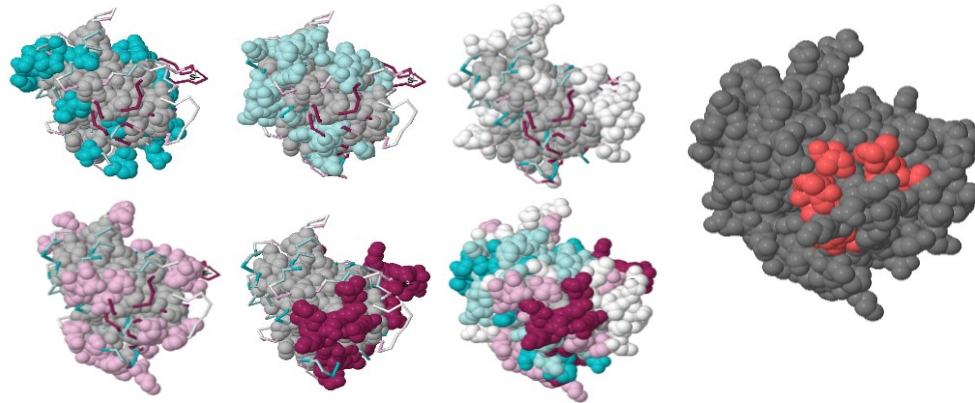
enquanto que o peptídeo exposto ao fago A8 foi identificado na cadeia A da estrutura da proteína “peroxidoxina mitocondrial” de *L. braziliensis*. A proteína diidroorotato desidrogenase foi então clonada e sua versão recombinante (33.9 kDa) foi purificada e utilizada em experimentos de ELISA, a fim de se verificar a reatividade contra anticorpos de soros de camundongos imunizados com os fagos A4 e A8.

Os resultados mostraram valores de densidade ótica (média \pm desvio padrão) de anticorpos anti-fago de $0,467 \pm 0,026$ e $0,565 \pm 0,055$, respectivamente, para os camundongos imunizados com o fago A4, e de $0,588 \pm 0,035$ e $0,663 \pm 0,041$, respectivamente, para os camundongos imunizados com o fago A8. Soros de camundongos que receberam salina ou foram vacinados com WTP ou RP apresentaram valores de $0,031 \pm 0,006$, $0,051 \pm 0,011$ e $0,062 \pm 0,010$, respectivamente. Um alinhamento da estrutura conformacional da proteína diidroorotato desidrogenase foi realizado com o objetivo de identificar as seqüências peptídicas A4 e A8, e os resultados mostraram que eles foram agrupados na região do cluster de proteínas, apresentando alta imunogenicidade predita pelo servidor Epitopia (Figura 19).

A



B



C

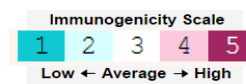
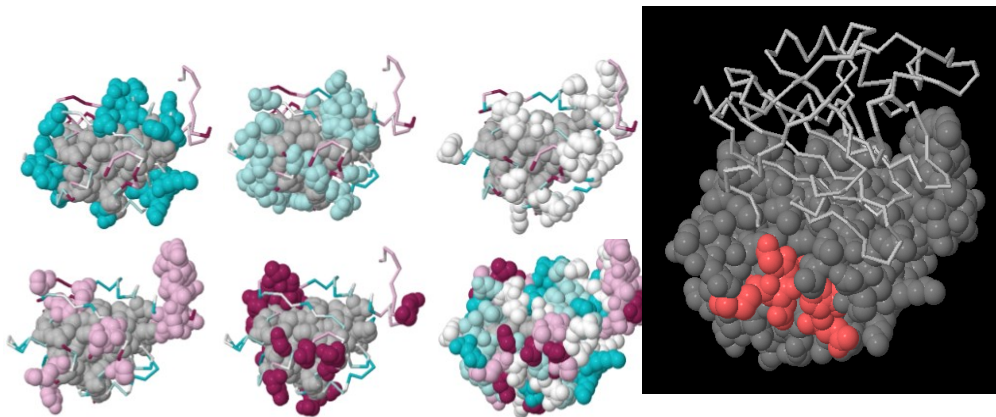


Figura 19 Alinhamento conformacional e regiões imunogênicas em estruturas protéicas. A proteína está em cinza e a região do alinhamento dos peptídeos na molécula está em rosa. A escala de imunogenicidade é representada de azul (baixa) a roxa (alta). A. Molécula 4WZH, em rosa o alinhamento dos peptídeos A4 e A8 formando um único cluster. B. Molécula 3CH7 e alinhamento conformacional A4. C. Molécula 4KCE e alinhamento conformacional A8.

6. DISCUSSÃO

As medidas de controle contra as leishmanioses se baseiam, principalmente, em medidas terapêuticas de pacientes infectados e no controle de vetores, mas os resultados obtidos têm sido pouco satisfatórios (SINGH *et al.*, 2014). Novas drogas terapêuticas são desafiadoras de se desenvolver, principalmente, devido ao alto custo envolvido, e pelo fato de as leishmanioses serem consideradas doenças negligenciadas (MENDONÇA *et al.*, 2018). Nesse cenário, a vacinação profilática pode ser uma maneira interessante de resolver esse problema em países onde a doença é endêmica. Para a LT, a proteção contra a infecção está associada ao desenvolvimento de uma imunidade do tipo Th1 específica para os parasitas, baseada na produção de citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-12 e GM-CSF. Em contraste, citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 e fator de crescimento transformante- β (TGF- β), entre outras moléculas antiinflamatórias, estão associados à suscetibilidade à infecção (COELHO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a triagem de bibliotecas de mimotopos exibidos por fagos, por meio de ciclos de biosseleção em phage display, representa uma abordagem interessante para identificar novos alvos biológicos (SOMERS *et al.*, 2002; FELICIANO *et al.*, 2014; COELHO *et al.*, 2015; SCHIEFERDECKER *et al.*, 2016). Nosso grupo identificou, recentemente, dois mimotopos expostos em fagos que foram imunogênicos em PBMCs de pacientes com LV, tendo sido posteriormente testados como candidatos à vacina contra a infecção experimental (RAMOS *et al.*, 2017). No presente estudo, usando uma estratégia experimental similar, mas ainda não aplicada para a LT, identificamos dois mimotopos imunogênicos com o intuito de testá-los como candidatos à vacina contra a doença. A abordagem pode ser considerada interessante, uma vez que os procedimentos de *biopanning* usados nos ensaios agregaram experimentos de ELISA para selecionar os melhores clones de fagos em seus estudos (ALBAN *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2014; TOLEDO-MACHADO *et al.*, 2015).

Uma vez que a resposta celular baseada na produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF, entre outros, é necessária para a proteção contra LT, definimos pela dosagem de citocina em células imunes estimuladas, como estratégia para definir os melhores imunógenos indutores de resposta Th1 para serem usados como alvos vacinais. Com os valores de IFN- γ e IL-4, a

seletividade e especificidade de cada clone foram calculadas, e os resultados mostraram que os clones A4 e A8 foram os que apresentaram os melhores resultados, e tais moléculas foram então testadas em modelo murino para proteção contra a infecção por *L. amazonensis*.

Os mimotopos expostos em fagos apresentam vantagens, tais como: (1) os fagos podem ser absorvidos pelas células hospedeiras e processados, permitindo a apresentação de antígenos por moléculas de MHC de classe I e II; (2) a produção destas partículas é mais fácil e menos dispendiosa do que a síntese convencional de peptídeos ou produção de proteínas recombinantes e (3) o produto final consiste de múltiplas cópias de vírus proporcionando alto nível de exposição dos mimotopos ao sistema imune do hospedeiro (COSTA *et al.*, 2015, CANO *et al.*, 2017). Além disso, outros dois pontos interessantes de serem considerados é que os fagos não são patogênicos para os seres humanos, embora possam se replicar dentro das células fagocíticas e potencializar a resposta imune nos hospedeiros vacinados (COELHO *et al.*, 2015), e a estimulação imune induzida pelos clones A4 e A8 pode ser atribuída ao próprio genoma do fago. Este fato pode ser explicado pela presença de motivos citosina-fosfato-guanosina (CpG), que são reconhecidos como uma família evolucionária conservada de receptores *Toll-Like*, como o *Toll-Like Receptor 9* (TLR-9), que é expresso por um número de células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas, estimulando assim a produção de citocinas imunoestimuladoras, tais como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, entre outras. Estes produtos foram também utilizados com ação adjuvante para a indução da resposta imune Th1 por outros grupos (LIPFORD *et al.*, 1997; ROMAN *et al.*, 1997; MOHSEN *et al.*, 2017).

Os achados aqui descritos são interessantes, pois a ausência de associação de adjuvantes possibilita o desenvolvimento de uma vacina mais segura para a proteção de cães e humanos contra a infecção por *Leishmania* (COSTA *et al.*, 2015; AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2016). O resultado da infecção por *L. amazonensis* depende, em grande parte, da resposta imune do hospedeiro frente ao parasita (WANASEN *et al.*, 2008). No presente estudo, células esplênicas estimuladas de camundongos imunizadas com A4 e A8 mostraram uma resposta tipo Th1 montada pela análise da ELISA de captura e citometria de fluxo. Citocinas como IFN- γ , IL-2 e IL-12 têm se mostrado eficazes na proteção contra *L. amazonensis* em modelos animais (SANCHEZ *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2018). O TNF- α também foi implicado na ativação de células fagocíticas para eliminar parasitas, além da estimulação de

células B para produzir anticorpos do isotipo IgG2a anti-*Leishmania* (Hernández-Ruiz e Becker, 2006). O GM-CSF foi também relacionado com ativação macrofágica e resistência de modelos murinos contra *L. infantum* (SANTOS et al., 2017), *L. major* (BAYIH et al., 2017) e *L. donovani* (SALDARRIAGA et al., 2006).

Estudos indicaram que as células T CD4⁺ apresentam a capacidade *in vivo* de aumentar a resposta das células T CD8⁺, ajudando a manter uma imunidade específica por longo período de tempo (KEENE & FORMAN, 1982; HUSMANN & BEVAN, 1988; SINGH & SUNDAR, 2012). Portanto, parece provável que uma atividade antileishmanial ideal pode ser alcançada se os subtipos de células T específicos de parasitas CD4⁺ e CD8⁺ forem ativados por um candidato ideal à vacina (COELHO et al., 2015; MARGARONI et al., 2017).

Em nosso trabalho, anticorpos monoclonais foram adicionados às culturas *in vitro* das células esplênicas estimuladas, e a produção de IFN- γ foi avaliada. Nos resultados, a redução mais significativa na produção da citocina foi encontrada quando os anticorpos anti-CD8 foram utilizados, corroborando com dados apresentados em outros estudos utilizando a tecnologia de *phage display* (COSTA et al., 2015; RAMOS et al., 2017). Por outro lado, embora os mimotopos A4 e A8 sejam compostos de resíduos de sete aminoácidos, uma diminuição na produção de IFN- γ foi também encontrada quando o anticorpo anti-CD4 foi adicionado às culturas. Embora esses peptídeos sejam considerados curtos, outros também mostraram que pequenos peptídeos podem induzir a ativação de células T CD4⁺ e induzir ao desenvolvimento de uma resposta imune específica para proteção contra distintas doenças (ATANACKOVIC et al., 2004; GERLACH et al., 2005 MARTINS et al., 2015).

A análise da sequência realizada no banco de dados do GenBank não revelou qualquer semelhança significativa com a sequência de aminoácidos de nossas moléculas com proteínas de *Leishmania* previamente caracterizadas, sugerindo que essas seqüências correspondem a epítomos conformacionais de proteínas dos parasitos. De fato, ensaios de bioinformática mostraram que os mimotopos A4 e A8 estão presentes na proteína desidrogenase dihidroorotato de *Leishmania*. Esta molécula é uma flavoenzima que participa da reação redox da via da pirimidina-biossíntese (PINHEIRO et al., 2013). Ela foi também avaliada como alvo terapêutico contra doenças, como artrite reumatóide, câncer e parasitoses (VYAS & GHATE, 2011), incluindo aquelas causadas por *Trypanosoma brucei*

(ARAKAKI *et al.*, 2008), *T. cruzi* (INAOKA *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2008) e *L. major* (CORDEIRO *et al.*, 2012).

A proteína desidrogenase dihidroorotato recombinante e os peptídeos sintéticos A4 e A8 não foram utilizados na estimulação das células esplênicas de camundongos vacinados. Como consequência, esse fato poderia ser considerado como uma limitação do estudo. No entanto, entendemos que a resposta imune específica do parasita e do fago, que foi observada quando o SLA e os clones foram usados para estimular *in vitro* as células imunes dos animais pode ser considerada relevante, uma vez que os resultados mostraram o desenvolvimento de uma resposta Th1 específica, quando comparados com os dados obtidos usando WTP ou RP como estímulos. Além disso, nosso propósito foi testar o próprio clone de fago como vacina, bem como postular seu uso em experimentos em outros hospedeiros mamíferos; justificando, assim, o emprego desses imunógenos em sua própria estrutura estrutural como candidatos à proteção contra a infecção por *Leishmania*.

Proteínas do parasita aplicadas como imunógenas podem induzir resposta celular e humoral contra os parasitas; entretanto, um candidato ideal deve ser capaz de induzir respostas de células T CD4⁺ e CD8⁺, bem como ser composta de diferentes partes imunogênicas do parasito em um único produto, tornando-a específica, imunogênica, mais fácil e barata de produzir, pois a produção de proteínas recombinantes únicas e peptídeos sintéticos é dispendiosa e possui custo elevado (MARTINS *et al.*, 2017a, 2017b; DIAS *et al.*, 2018).

Além disso, o projeto de vacinas no contexto de proteção de populações humanas contra a infecção por *Leishmania* apresenta problemas, tais como indivíduos exibindo um conjunto diferente de alelos, com especificidades de ligação potencialmente diferentes provavelmente reagindo com um conjunto diferente de moléculas, e alelos são expressos em diferentes frequências por etnias distintas (POLAND *et al.*, 2007; OYARZUN E KOBE, 2015). Como consequência, o uso de poucas moléculas como peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes dificulta a proteção de uma população heterogênea como seres humanos.

7. CONCLUSÃO

⇒ A tecnologia de *Phage Display* utilizada no presente trabalho, por meio de uma abordagem aplicada para a leishmaniose tegumentar, que foi baseada em processos de seleção negativa e positiva por ciclos de *biopanning*, bem como por estudos de imunogenicidade *in vitro* usando células humanas, possibilitou a identificação de dois novos imunógenos capazes de induzir resposta imune do tipo Th1.

⇒ Os clones de fagos A4 e A8 conferiram proteção em camundongos BALB/c contra a infecção por *L. amazonensis*, que foi baseada em níveis elevados de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF e baixos níveis de IL-4 e IL-10 nos animais imunizados e infectados, contando com a participação principalmente de células do subtipo T CD8⁺ na geração da resposta imune.

⇒ Estes achados demonstram que os clones de fagos A4 e A8 podem se constituir em novos candidatos para serem aplicados em estudos futuros como candidatos à vacina contra a leishmaniose tegumentar.

8. PERSPECTIVAS

⇒ Avaliar os clones de fagos contra a infecção com *L. braziliensis*.

⇒ Avaliar os clones de fagos isoladamente e em associação em modelo de hamster contra a leishmaniose tegumentar.

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. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, [S. l.], p. 1-20, 2014.
- AGHEBATI-MALEKI L, BAKHSHINEJAD B, BARADARAN B, MOTALLEBNEZHAD M, AGHEBATI-MALEKI A, NICKHO H, YOUSEFI M and MAJIDI J. Phage display as a promising approach for vaccine development. **Journal of Biomedical Science** v 23, p 66. 2016.
- ALBAN SM, MOURA JF, THOMAZ-SOCCOL V, BÜHRER SÉKULA S, ALVARENGA LM, MIRA MT, OLORTEGUI CC AND MINOZZO JC. Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. **PLoS One**, v 9, e106222. 2014.
- ALVAR J, CROFT S, OLLIARO P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 61, p. 223-274, 2006.
- ALVAR J, VELEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, DEN BOER M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, 7, e35671.
- ALVAR J, YACTAYO S, BERN C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in parasitology**, v. 22, p. 552-557, 2006.
- ALVES PT, FUJIMURA PT, MORAIS LD AND GOULART LR. Revisiting the CD14: epitope mapping by phage display. **Immunobiology** v 219, p 822–829, 2014.
- AMATO V. S. et al. Can we use a lower dose of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal American leishmaniasis?. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 85, n. 5, p. 818-819, 2011.
- AMATO V. S. et al. Mucocutaneous Leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with Liposomal Amphotericin B. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 341-342, 2000.
- ARAKAKI TL, BUCKNER FS, GILLESPIE JR, MALMQUIST NA, PHILLIPS MA, KALYUZHNIY O, LUFT JR, DETITTA GT, VERLINDE CL, VAN VOORHIS WC, HOL WG and MERRITT EA. Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Molecular Microbiology**, v 68, p 37–50, 2008.
- ASHFORD R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in dermatology**, v. 14, p. 523-532, 1996.
- ASHFORD R.W, DESJEUX P, DERAADT P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. **Parasitol Today**, v.8, p. 104-105, 1992.
- ASHFORD R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v.30, p. 1269-1281, 2000.

- ATANACKOVIC D, ALTORKI NK, STOCKERT E, WILLIAMSON B, JUNGBLUTH AA, RITTER E, SANTIAGO D, FERRARA CA, MATSUO M, SELVAKUMAR A, DUPONT B, CHEN YT, HOFFMAN EW, RITTER G, OLD LJ AND GNJATIC S. Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients. **The Journal of Immunology**, v 172, p 3289–3296, 2004.
- BALASEGARAM, M.; RITMEIJER, K.; LIMA, M.A.; BURZA, S.; ORTIZ GENOVESE, G.; MILANI, B.; GASPANI, S.; POTET, J.; CHAPPUIS, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opin Emerg Drugs**, 2012.
- BARBAS, C. F. et al. Phage Display: A Laboratory Manual. **Analytical Biochemistry**, p.194-195, 2001.
- BAYIH AG, DAIFALLA NS and GEDAMU L. Immune response and protective efficacy of a heterologous DNA-protein immunization with Leishmania superoxide dismutase B1. **Biomed Research International** 2017, 2145386, 2017.
- BENHAR, I. Biotechnology applications of phage and cell surface display. **Biotechnol. Adv**, Adv. 19, p.1-33, 2001.
- BEZERRA IPS, AMARAL ABIB M and ROSSI-BERGMANN B. Intranasal but not subcutaneous vaccination with LaAg allows rapid expansion of protective immunity against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v 36, p 2480–2486. 2018.
- BRASIL. **MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**. 1. ed. Brasília/DF: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017. 190 p.
- BRASIL. **MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL**. 1. ed. Brasília/DF: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014. 121 p.
- CANO PG, GAMAGE LNA, MARCINIUK K, HAYES C, NAPPER S, HAYES S AND GRIEBEL PJ. Lambda display phage as a mucosal vaccine delivery vehicle for peptide antigens. **Vaccine** v 35, p 7256–7263. 2017.
- COELHO EA, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, COSTA LE, TAVARES CA, SOTO M AND GOULART LR. Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v 48, p 370–379, 2015.
- COELHO EAF, TAVARES CA, CARVALHO FA, CHAVES KF, TEIXEIRA KN, RODRIGUES RC, CHAREST H, MATLASHEWSKI G, GAZZINELLI RT AND FERNANDES AP. 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** v71, p 3988–3994. 2003.
- CORDEIRO AT, FELICIANO PR, PINHEIRO MP and NONATO MC. Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania major. **Biochimie**, v 94, p 1739–1748, 2012.
- COSTA LE, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, MARTINS VT, DUARTE MC, LAGE DP, LIMA MI, PEREIRA NC, SOTO M, TAVARES CA, GOULART LR AND COELHO EA. Phage-fused

- epitopes from *Leishmania infantum* used as immunogenic vaccines confer partial protection against *Leishmania amazonensis* infection. **Parasitology** v 42, p 1335–1347, 2015.
- COSTA, Carlos Henrique Nery et al. Vaccines for the leishmaniasis: Proposals for a research Agenda. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e943, 2011.
- COSTA, L.E.; GOULART, L.R.; PEREIRA, N.C.J.; LIMA, M.I.; DUARTE, M.C.; MARTINS, V.T.; LAGE, P.S.; MENEZES-SOUZA, D.; RIBEIRO, T.G.; MELO M.N.; FERNANDES, A.P.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; COELHO, E.A. Mimotope-based vaccines of *Leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. **PLoS One**. v. 9, n. 10. 2014.
- COSTA, Lourena E et al. Mimotope-based vaccines of *leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.
- 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.
- 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, 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, 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.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v. 27, p. 305-318, 2004.
- DESJEUX P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 239-243, 2001.
- DIAS DS, RIBEIRO PAF, MARTINS VT, LAGE DP, COSTA LE, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, RAMOS FF, SANTOS TTO, LUDOLF F, OLIVEIRA JS, MENDES TAO, SILVA ES, GALDINO AS, DUARTE MC, ROATT BM, MENEZES-SOUZA D, TEIXEIRA AL and COELHO EAF. Vaccination with a CD4+ and CD8+ T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. **Translational Research**. doi: 10.1016/j.trsl.2018.05.001, 2018.

- DUARTE MC, LAGE DP, MARTINS VT, COSTA LE, CARVALHO AMRS, LUDOLF F, SANTOS TTO, VALE DL, ROATT BM, MENEZES-SOUZA D, FERNANDES AP, TAVARES CAP AND COELHO EAF. A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from *Leishmania braziliensis* cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. **Immunobiology** v 222, p 251–260. 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, 2016.
- DUARTE, Mariana Costa et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. [S.l.]: SBMT. 2016.
- FELICIANO ND, RIBEIRO VDA S, SANTOS FDE A, FUJIMURA PT, GONZAGA HT, GOULART LR AND COSTA-CRUZ JM. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 8, e2792. 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.
- FIGUEIREDO, E.M.; COSTA E SILVA, J.; BRAZIL, R.P. Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 2, p. 191-3. 1999.
- FORATTINI OP, Rabello EX, DAS COTRIM MD. Catalog of the entomological collections of the School of Public Health of the Universidade de Sao Paulo (2nd Series I) Culicidae. **Revista de saude publica**, v. 7, n. 2, p. 453-479. 1973.
- FOROUGH-PARVAR, F.; HATAM, G. Vaccines for canine leishmaniasis. **Adv Prev Med**. v. 2014, n. 569193, p. 1-9. 2014.
- GAGIC, Dragana et al. Exploring the secretomes of microbes and microbial communities using filamentous Phage Display. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], Frontiers. 2016.
- GERLACH JT, ULSENHEIMER A, GRÜNER NH, JUNG MC, SCHRAUT W, SCHIRREN CA, HEEG M, SCHOLZ S, WITTER K, ZAHN R, VOGLER A, ZACHOVAL R, PAPE GR and DIEPOLDER HM. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. **The Journal of Virology**, v 79, p 12425–12433, 2005.
- GILLESPIE, Portia M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2992–2995, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.071>. Acesso em: 14 dez. 2019.
- GONTINJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349. 2004.

- GONZALO, R.M.; DEL REAL, G.; RODRIGUEZ, J.R.; RODRIGUEZ, D.; HELJASVAARA, R.; LUCAS, P.; LARRAGA, V.; ESTEBAN, M. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 20, n. 7-8, p. 1226-31. 2002.
- GRAMICCIA M, GRADONI L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **Int J Parasitol**, v. 35, p. 1169-1180. 2005.
- GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol, Rev.** v. 6, p. 230–50. 1993.
- GROGL, M.; MARTIN, R.K.; ODUOLA, A.M.J.; MILHOUS, W.K.; KYLE, D.E. Characteristics of multidrug resistance in *Plasmodium* and *Leishmania*: detection of P-glycoprotein-like components. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 45, p. 98-111. 1991.
- GUHA, R.; DAS, S.; GHOSH, J.; NASKAR, K.; MANDALA, A.; SUNDAR, S.; DUJARDIN, J.C.; ROY, S. Heterologous priming–boosting with DNA and vaccinia virus expressing kinetoplastid membrane protein-11 induces potent cellular immune response and confers protection against infection with antimony resistant and sensitive strains of *Leishmania (Leishmania) donovani*. v. 31, n. 15, p. 1905-1915. 2013. **Vaccine**. 2013
- 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, 2001.
- HERNÁNDEZ-RUIZ J AND BECKER I. CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. **Salud Publica de México** v 48, p 430–439, 2006.
- HOTEZ PJ, REMME JH, BUSS P, ALLEYNE G, MOREL C, BREMAN JG. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, p. 871-878. 2004.
- HUSMANN LA and BEVAN MJ. Cooperation between helper T cells and cytotoxic T lymphocyte precursors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v 532, p 158, 1988.
- JAIN, Keerti; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**. [S.l: s.n.], 2015.
- KAECH, S.M.; WHERRY, E.J.; AHMED, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, vol.2, 2002.
- KEDZIERSKI, L.; EVANS, K.J. E. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**. p. 1-19. 2014.
- KEENE JÁ and FORMAN J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v 155, p 768, 1982.

- KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clin Transl Immunology**. v. 3, n. 3, p. e13. 2014.
- LAINSON R, BRAGA RR, DE SOUZA AA, POVOA MM, ISHIKAWA EA, SILVEIRA FT. Leishmania (Viannia) shawi sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 64, p. 200-207. 1989.
- LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. **Academic Press: London**, p. 1-120. 1987.
- 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.
- LIPFORD GB, BAUER M, BLANK C, REITER R, WAGNER H AND HEEG K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. **European Journal of Immunology** v 27, p 2340–2344. 1997.
- LUCA, P. M; MACEDO, A. B. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. **Frontiers in immunology**, v. 7, 2016.
- 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, 2011.
- MAPA. Suspensão da Licença **Produto Leishmune**. p. 1–12, 2008
- MARGARONI M, AGALLOU M, ATHANASIOU E, KAMMONA O, KIPARISSIDES C, GAITANAKI C AND KARAGOUNI E. Vaccination with poly(D,L-lactide- co-glycolide) nanoparticles loaded with soluble Leishmania antigens and modified with a TNF α -mimicking peptide or monophosphoryl lipid A confers protection against experimental visceral leishmaniasis. **The International Journal of Nanomedicine**, v 12, p 6169–6184, 2017.
- 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, 2014.
- MARTINEZ E, MOLLINEDO S, TORREZ M, MUÑOZ M, BAÑULS AL, LE PONT F. Co-infection by Leishmania amazonensis and L. infantum/L. chagasi in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 96, n. 5, p. 529–532, 2002.
- MARTINS VT, DUARTE MC, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, MENEZES-SOUZA D, COELHO CS, DE MAGALHÃES-SOARES DF, FERNANDES AP, SOTO M, TAVARES CA and COELHO EA. A Leishmania-specific hypothetical protein expressed in both promastigote and amastigote stages of Leishmania infantum employed for the serodiagnosis of, and as a vaccine candidate against, visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v 8, p 363, 2015.
- MARTINS VT, DUARTE MC, LAGE DP, COSTA LE, CARVALHO AM, MENDES TA, ROATT BM, MENEZES-SOUZA D, SOTO M and COELHO EA. A recombinant chimeric protein composed of human and mice-specific CD4+ and CD8+ T-cell epitopes protects against visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology** v 39, e12359, 2017.

- MARTINS VT, LAGE DP, DUARTE MC, CARVALHO AM, COSTA LE, MENDES TA, VALE DL, MENEZES-SOUZA D, ROATT BM, TAVARES CA, SOTO M and COELHO EA. A recombinant fusion protein displaying murine and human MHC class I- and II-specific epitopes protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Cellular Immunology**, v 313, p 32–42, 2017.
- MARTINS, V.T., CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; COSTA, L.E. MARTINS, A.M.C.C; LAGE, P.S.; LAGE, D.P.; DUARTE, M.C.; VALADARES, D.G.; MAGALHÃES, R.D.M.; RIBEIRO, T.G.; NAGEM, R.A.P.; DAROCHA, W.D.; RÉGIS, W.C.B.; SOTO, M.; COELHO, E.A.F.; FERNANDES, A.P.; TAVARES, C.A.P. Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7, n. 3. 2013.
- MARZOCHI MC, MARZOCHI KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthrozoosis and possibilities for their control. **Cad Saude Publica**, v. 10, n. 2, p. 359–375, 1994.
- MEDEIROS IM, NASCIMENTO ELT, HINRICHSEN SL. Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). In: DIP-Doenças Infecciosas e Parasitárias. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2005.
- MENDONÇA DVC, MARTINS VT, LAGE DP, DIAS DS, RIBEIRO PAF, CARVALHO AMRS, DIAS ALT, MIYAZAKI CK, MENEZES-SOUZA D, ROATT BM, TAVARES CAP, BARICHELLO JM, DUARTE MC and COELHO EAF. Comparing the therapeutic efficacy of different amphotericin B-carrying delivery systems against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology** 186, 24–35. 2018.
- MENDONÇA D.V, SOTO M, TAVARES CA, FARACO AA, COELHO EA. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 3, p. 235-242, 2015.
- MENDONCA M G, BRITO ME, RODRIGUES EH, BANDEIRA V, JARDIM ML, ABATH FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?. **The Journal of Infect Dis**, v. 189, n. 3, p. 1018-1023, 2004.
- MOHSEN MO, GOMES AC, CABRAL-MIRANDA G, KRUEGER CC, LEORATTI FM, STEIN JV AND BACHMANN MF. Delivering adjuvants and antigens in separate nanoparticles eliminates the need of physical linkage for effective vaccination. **The Journal of Controlled Release** v 251, p 92–100. 2017.
- MORENO, Javier et al. Use of a liesp/qa-21 vaccine (canileish) stimulates a appropriate th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1683, 2012.
- NAGILL, Rajeev; KAUR, Sukhbir. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**. [S.l.]: Elsevier. 2011
- OYARZUN P and KOBE B. Computer-aided design of T-cell epitope-based vaccines: addressing population coverage. **The International Journal of Immunogenetics**, v 42, p 313–321, 2015.

- PALATNIK-DE-SOUSA, Clarisa B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**. [S.l: s.n.]. 2008
- 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, 1988.
- PESSOA SB, MARTINS AV. Parasitologia médica. 11^a ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p.872 1988.
- PINHEIRO MP, EMERY FS and NONATO MC. Target sites for the design of anti-trypanosomatid drugs based on the structure of dihydroorotate dehydrogenase. **Current Pharmaceutical Design**, v 19, p 2615–2627, 2013.
- PINHEIRO MP, IULEK J and NONATO MC. Crystal structure of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase from Y strain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 369, p 812–817, 2008.
- POLAND GA, OVSYANNIKOVA IG, JACOBSON RM and SMITH DI. Heterogeneity in vaccine immune response: the role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**,v 82, p 653–664, 2007.
- 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.
- RAMIRO, M.J.; ZÁRATE, J.J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J.A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, v. 21, n. 20, p. 2474-2484. 2003.
- RAMOS FF, COSTA LE, DIAS DS, SANTOS TTO, RODRIGUES MR, LAGE DP, SALLES BCS, MARTINS VT, RIBEIRO PAF, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, DIAS ACS, ALVES PT, VIEIRA ELM, ROATT BM, MENEZES-SOUZA D, DUARTE MC, TEIXEIRA AL, GOULART LR AND COELHO EAF. 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. **Parasites & Vectors** v 10, p 617. 2017.
- ROMAN M, MARTIN-OROZCO E, GOODMAN JS, NGUYEN M-D, SATO Y, RONAGHY A, KORNBLUTH RS, RICHMAN DD, CARSON DA AND RAZ E. Immunostimulatory DNA sequences function as Th1 promoting adjuvants. **Nature Medicine** v 3, p 849–854 1997.
- SACKS D & NOBEN-TRAUTH N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nat Rev Immunol**. 2(11):845-58. 2002.
- SALDARRIAGA OA, TRAVI BL, PARK W, PEREZ LE and MELBY PC. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. **Vaccine** v 24, p 1928–1940, 2006.

- 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.
- SAMANT, M.; GUPTA, R.; KUMARI, S.; MISRA, P.; KHARE, P.; KUSHAWAHA, P.K.; SAHASRABUDDHE, A.A.; DUBE, A. Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of Leishmania donovani generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol**. 2009.
- SANCHEZ MV, ELIÇABE RJ, DI GENARO MS, GERMANÓ MJ, GEA S, GARCÍA BUSTOS MF, SALOMÓN MC, SCODELLER EA and CARGNELUTTI DE. Total Leishmania antigens with Poly(I:C) induce Th1 protective response. **Parasite Immunol**. 2017.
- SANTOS TTO, MARTINS VT, LAGE DP, COSTA LE, SALLES BCS, CARVALHO AMRS, DIAS DS, RIBEIRO PAF, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, MACHADO-DE-ÁVILA RA, ROATT BM, DE MAGALHÃES-SOARES DF, MENEZES-SOUZA D, COELHO EAF AND DUARTE MC. Probing the efficacy of a heterologous Leishmania/l. Viannia braziliensis recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of L. infantum in BALB/c mice. **Acta Tropica** v 171, p 8–16. 2017.
- SCHIEFERDECKER A, OBERLE A, THIELE B, HOFMANN F, GÖTHEL M, MIETHE S, HUST M, BRAIG F, VOIGT M, VON PEIN UM, KOCH-NOLTE F, HAAG F, ALAWI M, INDENBIRKEN D, GRUNDHOFF A, BOKEMEYER C, BACHER U, KRÖGER N AND BINDER M. A transplant ‘immunome’ screening platform defines a targetable epitope fingerprint of multiple myeloma. **Blood** v 127, p 3202–3214, 2016.
- 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, 1996.
- SCOTT, P. Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. **Immunol. Res.**, v. 27, p. 489-498, 2003.
- SHAW JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil. VI. Observations on the seasonal variations of Lutzomyia flaviscutellata in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (Leishmania mexicana amazonensis). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 709-717, 1972.
- SILVEIRA FT, ISHIKAWA EA, DE SOUZA AA, LAINSON R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by Leishmania (Viannia) lindenbergi n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, v. 9, p. 43-50, 2002.
- SILVEIRA FT, LAINSON R, CORBETT CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239-251, 2004.
- SILVEIRA FT, SHAW JJ, BRAGA RR, ISHIKAWA E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: Leishmania (Viannaia) lainsoni sp.n., a new parasite from the State of Para. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 289-291, 1987.

- SINGH B and SUNDAR S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v 30, p 3834–3842, 2012.
- SINGH OP, HASKER E, SACKS D, BOELAERT M and SUNDAR S. Asymptomatic Leishmania infection: a new challenge for Leishmania control. **Clinical and Infectious Diseases** 58, 1424–1429, 2014.
- SMITH, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.
- SMITH, George P; PETRENKO, Valery A. *Phage Display*. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 2, p. 391–410, 1997.
- SOMERS VA, BRANDWIJK RJ, JOOSTEN B, MOERKERK PT, ARENDS JW, MENHEERE P, PIETERSE WO, CLAESSEN A, SCHEPER RJ, HOOGENBOOM HR AND HUFTON SE. A panel of candidate tumor antigens in colorectal cancer revealed by the serological selection of a phage displayed cDNA expression library. **The Journal of Immunology** v 169, p 2772–2780, 2002.
- SRIVASTAVA, Saumya et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 277, 2016.
- STAGER, S.; ALEXANDER, J.; KIRBY, A.C.; BOTTO, M.; ROOIJEN, N.V.; SMITH, D.F.; BROMBACHER, F.; KAYE, P.M. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. **Nat Med**. v. 9, n. 10, p. 1287-92. 2003.
- STAGER, S.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. **J. Immunol.** v. 165, n. 12, p. 7064–7071. 2000.
- STEBUT, E.V. *Leishmaniasis*. **J Dtsch Dermatol Ges**, p. 191-201. 2014.
- SUKUMARAN, B.; TEWARY, P.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v. 21, n. 11-12, p. 1292-1299. 2003.
- SZALAI, K.; JENSEN-JAROLIM, E. Vaccination strategies based on the mimotope concept. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**. 2008.
- TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Rev Mol Diagn**. v. 3, n. 5, p. 657-67. 2003.
- TESH RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.52(3) p.287-92, 1995.
- TOLEDO-MACHADO CM, BUENO LL, MENEZES-SOUZA D, MACHADO-DE-AVILA RA, NGUYEN C, GRANIER C, BARTHOLOMEU DC, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C AND FUJIWARA RT. Use of phage display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. **Parasites & Vectors** v 8, p 133, 2015.

- VASCONCELOS D.R B. Detecção de *Leishmania chagasi* em *Lutzomyia longipalpis* por meio de qPCR em tempo real: triagem de genes e métodos quantitativos. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária**. 2010.
- VYAS VK and GHATE M. Recent developments in the medicinal chemistry and therapeutic potential of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors. **Mini Review in Medicinal Chemistry**, v 11, p 1039–1055, 2011.
- WANASEN N, XIN L and SOONG L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *International Journal for Parasitology*, v 38, p 417–429, 2008.
- WERNECK G. L. Leishmaniose visceral no Brasil: justificativa e preocupações relacionadas ao controle de reservatórios. **Rev. Saúde Pública**. Vol 48 n 5 São Paulo, 2014
- WILLATS, William G.T. Phage Display: Practicalities and prospects. **Plant Molecular Biology**. v. 50, n. 6, p. 837–854, 2002.
- WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb. Pathog.** v. 38, p. 147-60. 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/TDR. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. **Natures Reviews Microbiology**, v. 5, p. 7–16, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. [S. l.]: **Technical Report Series**, 2010. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em: 11 nov. 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. *Natures Reviews*. **Fact sheet**, 2014.
- ZANIN, F.H.; COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; MARQUES-DA-SILVA, E.A.; SILVA COSTA, M.M.; REZENDE, S.A.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes Infect** v. 9, n. 9, p. 1070–1077. 2007.

10. APÊNDICE

10.1 Artigo publicado

Parasitology

cambridge.org/par

Research Article

*Co-senior authors.

On this article: Carvalho GB *et al.* (2018). High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis patients and their use as vaccine candidates against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology* 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001403>

Received: 3 May 2018

Revised: 5 July 2018

Accepted: 10 July 2018

Key words:

Immune response; *Leishmania amazonensis*; peripheral blood mononuclear cells; phage display; tegumentary leishmaniasis; vaccine

Author for correspondence:

Eduardo A. F. Coelho, E-mail: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis patients and their use as vaccine candidates against *Leishmania amazonensis* infection

Gerusa B. Carvalho¹, Lourena E. Costa¹, Daniela P. Lage², Fernanda F. Ramos¹, Thais T. O. Santos¹, Patrícia A. F. Ribeiro¹, Daniel S. Dias¹, Beatriz C. S. Salles², Mariana P. Lima¹, Lívia M. Carvalho², Ana C. S. Dias³, Patrícia T. Alves³, Michelle L. Franklin¹, Renata A. M. Silva¹, Mariana C. Duarte^{1,4}, Daniel Menezes-Souza^{1,4}, Bruno M. Roatt², Miguel A. Chávez-Fumagalli⁵, Luiz Ricardo Goulart^{3,5,*}, Antonio L. Teixeira^{1,6,7,*} and Eduardo A. F. Coelho^{1,4,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil; ²Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 35.400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil; ³Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Amazonas s/n, Campus Umuarama, Bloco 2E, Sala 248, 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil; ⁴Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Minas Gerais, Brazil; ⁵Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California-Davis, Davis, CA 95616, USA; ⁶Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil and ⁷Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston, 1941 East Road, Houston, TX 77041, USA

Abstract

In the current study, phage-exposed mimotopes as targets against tegumentary leishmaniasis (TL) were selected by means of bio-panning cycles employing sera of TL patients and healthy subjects, besides the immune stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected from untreated and treated TL patients and healthy subjects. The clones were evaluated regarding their specific interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) production in the *in vitro* cultures, and selectivity and specificity values were calculated, and those presenting the best results were selected for the *in vivo* experiments. Two clones, namely A4 and A8, were identified and used in immunization protocols from BALB/c mice to protect against *Leishmania amazonensis* infection. Results showed a polarized Th1 response generated after vaccination, being based on significantly higher levels of IFN- γ , IL-2, IL-12, tumour necrosis factor- α (TNF- α) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF); which were associated with lower production of specific IL-4, IL-10 and immunoglobulin G1 (IgG1) antibodies. Vaccinated mice presented significant reductions in the parasite load in the infected tissue and distinct organs, when compared with controls. In conclusion, we presented a strategy to identify new mimotopes able to induce Th1 response in PBMCs from TL patients and healthy subjects, and that were successfully used to protect against *L. amazonensis* infection.

Introduction

Leishmaniasis are diseases caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. This disease complex is characterized by high morbidity and mortality, and it is present in 98 countries in three continents (Asia, Africa and South and Central America), with 380 million people at risk of infection (WHO, 2010; Hirve *et al.*, 2017). In addition, the geographic distribution of disease is expanding throughout the Western hemisphere, and it has been already found in North America, reaching as far as Southern Canada (Duarte *et al.*, 2016).

The treatment against leishmaniasis is inadequate, since limitations such as side-effects, high cost and/or parasite resistance are registered (Sundar and Chakravarty, 2013; Sundar and Singh, 2016). The main clinical manifestations of disease are tegumentary (TL) and visceral (VL) leishmaniasis. TL is the most common clinical form, and it is found in Africa and Asia being caused by *Leishmania major* species, whereas in the Americas the *L. mexicana*, *L. braziliensis* and *L. amazonensis* species are the main responsible by disease (Dias *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2017). Among different parasite species causing leishmaniasis in mammalian hosts, *L. amazonensis* is particularly interesting, due to the large spectrum of clinical disease

© Cambridge University Press 2018

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA GERUSA BRANDÃO DE CARVALHO

Realizou-se, no dia 10 de junho de 2020, às 14:00 horas, com transmissão eletrônica de videoconferência através da plataforma Skipe, pela Universidade Federal de Minas Gerais, a 182ª defesa de tese, intitulada "TECNOLOGIA DE PHAGE DISPLAY APLICADA PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES E APLICAÇÃO COMO VACINAS CONTRA A DOENÇA", apresentada por GERUSA BRANDÃO DE CARVALHO, número de registro 2018655900, graduada no curso de NUTRIÇÃO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Orientador (UFMG), Dra. Lourena Emanuele Costa – Orientadora (UFMG), Dra. Ana Thereza Chaves (UFMG), Prof. Mario da Silva Giusta (UNA-BH), Profa. Patrícia Aparecida Fernandes Ribeiro (UNA-BH), Dra. Grasielle de Sousa Vieira Tavares (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

(X) Aprovada

() Reprovada

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

Belo Horizonte, 10 de junho de 2020.

Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho – Presidente da banca

Dra. Lourena Emanuele Costa

Dra. Ana Thereza Chaves

Prof. Mario da Silva Giusta

Profa. Patrícia Aparecida Fernandes Ribeiro

Dra. Grasielle de Sousa Vieira Tavares

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1: Comprovante de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.



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

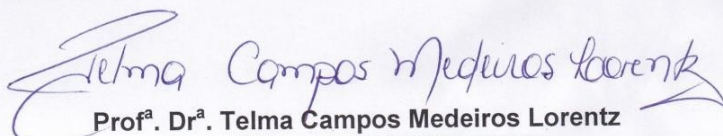
Projeto: CAAE – 32343114.9.0000.5149

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

DECISÃO


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

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


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

Anexo 2: Comprovante de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG

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 Tecnico
Departamento: Colegio Tecnico

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.