

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

**Avaliação da proteína fator
eucarioto de alongamento 1
beta de *Leishmania* (EF1 β)
como candidata para uso
no diagnóstico e vacina
contra as leishmanioses**

Thaís Teodoro de Oliveira Santos

Julho de 2021
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Thaís Teodoro de Oliveira Santos

Avaliação da proteína fator eucarioto de alongamento 1 beta de *Leishmania* (EF1 β) como candidata para uso no diagnóstico e vacina contra as leishmanioses

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Linha de Pesquisa: Leishmanioses

Orientador: Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho.

Coorientadores: Prof. Ricardo Toshio Fujiwara e Dra. Mariana Santos Cardoso.

Belo Horizonte
2021

Santos, Thais Teodoro de Oliveira.

SA237a Avaliação da proteína fator eucarioto de alongamento 1 beta de Leishmania (EF1- β) como candidata para uso no diagnóstico e vacina contra as leishmanioses [manuscrito]. Thais Teodoro de Oliveira Santos. - Belo Horizonte: 2021.

111f.: il.

Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho.

Coorientador (a): Ricardo Toshio Fujiwara; Mariana Santos Cardoso.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Diagnóstico. 2. Eucariotos. 3. Proteínas Recombinantes. 4. Vacinas de DNA. 5. Leishmaniose. 6. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Fujiwara, Ricardo Toshio. III. Cardoso, Mariana Santos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. 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 TROPICAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às **13:00** horas do dia 04 de agosto de 2021, pela plataforma GOOGLE MEET (<https://meet.google.com/pny-hkjb-ynz>), realizou-se a sessão pública para a 198ª defesa de tese de **THAIS TEODORO DE OLIVEIRA SANTOS**, número de registro 2019715036, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor **EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. EDUARDO SÉRGIO DA SILVA (UFSJ)**, **PROF. MARIO DA SILVA GIUSTA (UNA-BH)**, **PROFA. ANA THEREZA CHAVES (UFMG)**, **PROFA. DANIELA PAGLIARA LAGE (UFMG)**, **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Avaliação do potencial uso da proteína fator de alongamento 1- β de Leishmania como candidata ao diagnóstico sorológico das leishmanioses e para a vacinação contra a infecção causada pelo parasito Leishmania infantum**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a **Tese de Doutorado**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 04 de agosto de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Sergio da Silva, Usuário Externo**, em 04/08/2021, às 15:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Pagliara Lage, Usuário Externo**, em 04/08/2021, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) decurso de pós-graduação**, em 04/08/2021, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Thereza Chaves Lages, Usuário Externo**, em 04/08/2021, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mário da Silva Giusta, Usuário Externo**, em 05/08/2021, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0868405** e o código CRC **36A4110A**.

RESUMO

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. O controle desse complexo de doenças é crucial para a redução dos casos em humanos e cães, que são considerados os principais reservatórios urbanos do parasito *Leishmania*. Os métodos de diagnóstico são baseados em testes parasitológicos e imunológicos, que apresentam variável sensibilidade para a detecção de casos com baixa carga parasitária e sorologia antileishmanial, além de variável especificidade, uma vez que reações cruzadas com doenças causadas por outros Tripanossomatídeos acabam por ocorrer e dificultam assim o diagnóstico. Limitações crescentes nas estratégias quimioterápicas disponíveis e a ausência de uma vacina eficaz aprofundam a dificuldade no controle desse complexo de doenças. Portanto, novos estudos que buscam identificar antígenos mais sensíveis e específicos para o uso como diagnóstico e a pesquisa por novos agentes profiláticos são de importância. Desse modo, no presente trabalho, a proteína denominada como fator eucarioto de alongamento 1 beta de *Leishmania* (EF1 β), que foi selecionada através de ensaios de imunoproteômica feitos usando o extrato proteico de *Leishmania infantum*, foi produzida sob a forma recombinante e avaliada em testes de ELISA para o diagnóstico sorológico das leishmanioses visceral canina e humana. Devido à elevada similaridade na sequência de aminoácidos da proteína no gênero *Leishmania*, ensaios foram também realizados para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar humana. A proteína rEF1 β apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, sendo capaz de identificar pacientes com leishmanioses visceral e tegumentar, bem como cães com a doença sintomática e assintomática, com ausência de reação cruzada significativa com outras classes de soros. A proteína recombinante apresentou também excelentes resultados como marcador sorológico para o acompanhamento de pacientes após o tratamento e cura clínica da doença. Como alvo vacinal, EF1 β foi administrada como vacina de DNA ou proteína recombinante associada a saponina como adjuvante em camundongos BALB/c, e os animais imunizados desenvolveram uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada por altos níveis de IFN- γ , IL-12, GM-CSF, e anticorpos do subtipo IgG2a, antes da infecção com *L. infantum*. A resposta imune foi mantida após a infecção e se relacionou com reduções significativas na carga parasitária no fígado, baço, medula óssea e linfonodos dos animais imunizados, quando comparados aos resultados obtidos nos grupos controles. A vacinação com rEF1 β mais saponina induziu a uma resposta Th1 mais robusta e melhor proteção parasitológica, quando comparada à vacina com DNA. Em conclusão, os resultados sugerem que a proteína EF1 β pode ser considerada como um agente promissor para estudos futuros voltados para o diagnóstico e/ou candidato à vacina contra as leishmanioses.

Palavras-chave: Diagnóstico; fator eucarioto de alongamento 1 beta de *Leishmania*; proteína recombinante; vacina de DNA; leishmanioses.

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected tropical diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Controlling this complex of diseases is crucial for reducing cases in humans and dogs, which are considered the main urban reservoirs of the *Leishmania* parasite. Diagnostic methods are based on parasitological and immunological tests, which have variable sensitivity for detecting cases with low parasite load, in addition to variable specificity, since cross-reactions with diseases caused by other trypanosomatids are present. Growing limitations in available chemotherapy strategies and the absence of an effective vaccine deepen the difficulty in controlling leishmaniasis. Therefore, new studies that seek to identify more sensitive and specific antigens for potential use as a diagnosis and prophylactic agent are extremely important. Thus, in the present work, the protein called *Leishmania* elongation factor 1 beta (EF1 β) was selected through immunoproteomic assay performed in *Leishmania infantum* protein extracts, and it was produced as recombinant antigen and tested in ELISA experiments for the serological diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. Due to the high similarity in the protein amino acid sequence in the *Leishmania* genus, assays were also performed for the diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. The rEF1 β protein showed 100% sensitivity and specificity, being able to identify patients with visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as symptomatic and asymptomatic dogs, with no significant cross-reactivity with other serum classes. The recombinant protein also showed excellent results as a serological marker for the follow-up of patients after treatment and cure of disease. As a vaccine candidate, the antigen was administered as DNA vaccine or recombinant protein plus saponin as adjuvant in BALB/c mice, and immunized animals developed a Th1 type immune response, characterized by high levels of IFN- γ , IL-12, GM-CSF, and IgG2a subtype antibodies, before infection, which was maintained after challenge and corroborated with significant reductions in the parasite load in the liver, spleen, bone marrow and lymph nodes of the immunized animals, when compared to data obtained in the control groups. The vaccination using rEF1 β plus saponin induced a more robust Th1 response and better parasitological protection, when compared to the DNA vaccine. In conclusion, results suggest that EF1 β can be considered as a promising agent for diagnosis and/or as a vaccine candidate against leishmaniasis.

Keywords: Diagnosis; *Leishmania* eukaryotic elongation factor-1 beta protein; recombinant protein; DNA vaccine; leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo (2019).....	22
Figura 2. Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo (2019).....	22
Figura 3. Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i>	27
Figura 4. Delineamento experimental geral.....	42
Figura 5. Delineamento da experimentação animal.....	43
Figura 6. Predição de epítomos lineares de célula B para a proteína EF1 β (LINF_340014000).....	56
Figura 7. Predição de epítomos de células T CD4+ presentes na proteína EF1 β (LINF_340014000).....	57
Figura 8. Predição de epítomos de células T CD8+ presentes na proteína LINF_340014000.....	58
Figura 9. Alinhamento realizado pelo programa ClustalW.....	60
Figura 10. Alinhamento global, realizado pelo programa <i>ClustalW</i> , de sequências proteicas e epítomos de linfócitos T homólogos à proteína EF1 β de <i>L. infantum</i> com outros tripanossomatídeos e hospedeiros.....	62
Figura 11. Análise eletroforética em gel de agarose da PCR de gradiente para o gene que codifica a proteína EF1 β (LINF_340014000).....	63
Figura 12. Análise eletroforética em gel de agarose 1% da PCR para amplificação do gene que codifica a proteína EF1 β (LINF_340014000).....	64
Figura 13. Análise eletroforética em gel de agarose dos vetores plasmidiais, pET28a-TEV (esquerda) e pVAX1(direita), após a dupla digestão com as enzimas de restrição, BamHI e EcoRI.....	64
Figura 14. Cromatograma obtido durante purificação da proteína rEF1 β (LINF_340014000) de <i>L. infantum</i>	65

Figura 15. Gel de poliacrilamida 12% (esquerda) e <i>western blotting</i> (direita) da purificação da proteína recombinante rEF1 β de <i>L. infantum</i>	66
Figura 16. Desempenho do diagnóstico em amostras de soro de humanos saudios e portadores das leishmanioses, bem como para os portadores de doenças com possibilidade de reações cruzadas, utilizando a proteína rEF1 β e SLA de <i>L. infantum</i> e <i>L. braziliensis</i>	67
Figura 17. Comparação da eficiência da proteína rEF1 β e SLA de <i>Leishmania</i> em discriminar por testes sorológicos de pacientes humanos tratados dos não tratados	69
Figura 18. Desempenho do diagnóstico em amostras de cães saudios e portadores das leishmanioses, bem como para os portadores de doenças com possibilidade de reações cruzadas, utilizando a proteína rEF1 β e SLA de <i>L. infantum</i> e <i>L. braziliensis</i>	70
Figura 19. Ensaio de linfoproliferação em culturas de PBMCs de pacientes com leishmaniose visceral e indivíduos saudáveis.....	73
Figura 20. Ensaio de citocinas humanas nos sobrenadantes de culturas de PBMC.....	74
Figura 21. Resposta celular induzida antes da infecção de desafio.....	75
Figura 22. Produção de anticorpos após as imunizações e antes da infecção desafio.....	76
Figura 23. Produção de citocinas induzida após infecção por <i>L. infantum</i>	76
Figura 24. Envolvimento de células T na produção de IFN- γ nos animais vacinados e infectados	77
Figura 25. Produção de nitrito após infecção desafio.....	79
Figura 26. Resposta humoral induzida após infecção com <i>L. infantum</i>	80
Figura 27. Avaliação da carga parasitária.....	81
Figura 28. Vetor de clonagem.....	109
Figura 29. Vetor de expressão em procariotos	110
Figura 30. Vetor de expressão em eucariotos.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Hospedeiros e vetores das principais espécies causadoras das Leishmanioses no Brasil.	24
Tabela 2. Relação das proteínas homólogas a EF1 β e seus identificadores utilizados para o alinhamento global (<i>ClustalW</i>).....	59
Tabela 3. Desempenho diagnóstico em amostras de soros de pacientes com LV e indivíduos saudáveis, bem como com portadores de reação cruzada, utilizando a proteína rEF1 β e SLA.....	71
Tabela 4. Desempenho diagnóstico em amostras de soro de cães saudáveis e portadores da LV, bem como com doenças que causam reações cruzadas, utilizando a proteína rEF1 β e SLA.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Aminoácido
- AUC – Área sobre a curva
- BCR – Receptor de célula B
- DAB – Diaminobenzidina
- EF1 β – Proteína fator eucarioto de alongamento 1 beta de *Leishmania*
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- MHC-I – Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
- MHC-II – Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
- BLAST – Ferramenta de busca de alinhamento local básico
- CEUA – Comissão de ética no uso de animais
- FLPC – Cromatografia líquida rápida de proteínas
- HLA – Antígeno leucocitário humano e suas variações
- IgG1 – Imunoglobulina G1
- IgG3 – Imunoglobulina G3
- IgG2a – Imunoglobulina G2a
- iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
- IPTG – Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
- J – Índice de Youden
- kDNA – Ácido desoxirribonucléico do cinetoplasto
- LC – Leishmaniose cutânea
- LM – Leishmaniose mucosa
- LPG – Lipofosfoglicano
- LT – Leishmaniose tegumentar
- LTH – Leishmaniose tegumentar humana
- LV – Leishmaniose visceral
- LVC – Leishmaniose visceral canina
- L VH – Leishmaniose visceral humana
- MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
- NEB – New England Biolabs
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OPD – Ortofenilenodiamina
- ORF – Fase de leitura aberta

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PMA – Miristato acetato de phorbol

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

ROC – Característica de operação do receptor

SDS-PAGE – Dodecil-sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida

SLA – Antígeno solúvel de *Leishmania*

T CD4⁺ – Linfócito T com *cluster* de diferenciação 4

T CD8⁺ – Linfócito T com *cluster* de diferenciação 8

TCR – Receptor de célula T

TLR – Receptor tipo *Toll*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 LEISHMANIOSES	21
1.2 ASPECTOS GERAIS DO PARASITO <i>LEISHMANIA</i>	24
1.3 MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DAS LEISHMANIOSES	28
1.4 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES	31
1.5 RESPOSTA IMUNE	35
1.6 VACINAS CONTRA AS LEISHMANIOSES	36
2 JUSTIFICATIVA	40
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
5.1 FASE I – BIOINFORMÁTICA	44
5.1.1 Seleção da proteína de <i>Leishmania</i> candidata ao diagnóstico e vacina.....	44
5.1.2 Predição de epítomos	44
5.1.2.1 Linfócitos B	44
5.1.2.2 Linfócitos T CD4 ⁺	44
5.1.2.3 Linfócitos T CD8 ⁺	45
5.1.3 Alinhamento de proteínas homólogas	45
5.2 FASE II – PRODUÇÃO DA PROTEÍNA E DNA RECOMBINANTE	46
5.2.1 Clonagem do candidato à expressão heteróloga.....	46
5.2.2 Preparação do vetor plasmidial para as imunizações	47
5.2.3 Expressão heteróloga e purificação da proteína rEF1β	47
5.2.4 SDS-PAGE e Western Blotting	48
5.5 FASE III – TESTE PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	49

5.3.1	Aprovação do Comitê de Ética	49
5.3.2	Amostras biológicas	49
	<i>Soroteca humana</i>	49
	<i>Acompanhamento sorológico pós-terapêutico</i>	50
	<i>Soroteca canina</i>	50
5.3.3	Produção do antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>	50
5.3.4	ELISA para o diagnóstico das leishmanioses.....	51
5.3.5	Análise sorológica após o tratamento	51
5.3.6	Análise estatística	52
5.4	FASE IV – ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO	52
5.4.1	Aprovação do Comitê de Ética Animal.....	52
5.4.2	Camundongos BALB/c	52
5.4.4	Amostras biológicas e ensaio <i>in vitro</i> de PBMCs	52
5.4.6	Experimentação animal	53
	5.4.6.1 Ensaio de imunização	53
	5.4.6.2 Eutanásia após a imunização e infecção com <i>Leishmania infantum</i>	53
	5.4.6.3 Eutanásia após a infecção com <i>Leishmania infantum</i>	53
	5.4.6.4 Resposta celular.....	54
	5.4.6.5 <i>Imunoblotting</i>	54
	5.4.6.6 Análise da carga parasitária por diluição limitante	54
5.4.7	Análise estatística dos dados	55
6	RESULTADOS	56
6.1	FASE I – BIOINFORMÁTICA	56
	6.1.1 Predição de epítomos para diagnóstico e vacina	56
	6.1.1.1 Linfócitos B	56
	6.1.1.2 Linfócitos T CD4 ⁺	57
	6.1.1.3 Linfócitos T CD8 ⁺	57
	6.1.2 Alinhamento de proteínas homólogas de outras espécies de parasitos e hospedeiros	58

6.2 FASE II – PRODUÇÃO DA PROTEÍNA E DNA RECOMBINANTE	63
6.2.1 Clonagem do candidato à expressão heteróloga.....	63
6.2.2 Expressão heteróloga e purificação da proteína eF1 β (LINF_340014000) por cromatografia de afinidade	65
6.3 FASE III – TESTE PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	66
6.3.1 ELISA para o diagnóstico da leishmaniose humana	66
6.3.2 Elisa para o diagnóstico da leishmaniose canina.....	70
6.4 FASE IV – ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO	73
6.4.1 Avaliação da resposta <i>in vitro</i> em culturas de <i>PBMCs</i>	73
6.4.2 Avaliação da resposta imune em animais antes da infecção desafio.....	74
6.4.3 Avaliação da resposta imune após a infecção	76
6.4.4 Avaliação da carga parasitária nos órgãos dos animais infectados	80
7 DISCUSSÃO	82
8 CONCLUSÃO.....	88
9 PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICE	105
ANEXO.....	109

Colaboradores:

Dr. Prof. Nelder de Figueiredo Gontijo (UFMG / MG)

Dr. Prof. Maurício Roberto Viana Sant'anna (UFMG / MG)

Dr. Prof. Bruno Mendes Roatt (UFOP / MG)

Dr. Prof. Ricardo Nascimento Araújo (UFMG / MG)

Dr. Prof. Héliida Monteiro de Andrade (UFMG / MG)

Msc. Angelita de Paula Pimenta (UFMG / MG)

Msc. Ulisses Antônio Natividade (UFMG / MG)

Msc. Lívia Mendes Carvalho (UFOP / MG)

Msc. Williane Siqueira (UFMG / MG)

Dr. Jordana Luíza de Lima Celeste (UFMG / MG)

Dr. João Luís Reis Cunha (UFMG / MG)

Joana Martins Poletto (UFMG / MG)

João Pedro Thimotheo Batista (UFMG / MG)

Renata Aguiar Menezes Silva (UFMG / MG)

Jamil Silviano de Oliveira (UFMG / MG)

Instituições Parceiras:

Universidade Federal de Minas Gerais

Universidade Federal de Ouro Preto

Suporte Financeiro:

CNPq

CAPES

FAPEMIG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos meus guias espirituais, anjos da guarda, mãe Maria do Rosário e toda a minha egrégora de luz. Agradeço por todo o trabalho que temos feito juntos, pela presença e apoio!

Agradeço a mim pelo meu esforço e persistência nessa caminhada da vida!

Agradeço ao meu pai e a minha mãe pela vida que me deram. Sei que eles fizeram o melhor que eles poderiam ter feito na minha criação e na de meus irmãos!

Agradeço aos meus irmãos, Gabriela e Pedro, pelo apoio e companheirismo!

Agradeço ao chefe mais top das galáxias Eduardo Coelho pela orientação e por ter acreditado e confiado em mim! Hoje eu agradeço também por ele ter assumido a responsabilidade de me orientar!

Agradeço a minha amada coorientadora Mariana Cardoso pela orientação e por ser a representação do amor em pessoa. Sou extremamente grata por tudo que ela já fez por mim!

Agradeço ao meu coorientador Ricardo Fujiwara por ter querido me ajudar e por ter me aberto novamente as portas de seu laboratório.

Agradeço a equipe do laboratório LIMT (Laboratório de Infectologia e Medicina Tropical), não só pelo trabalho em equipe, mas também pela amizade que criamos.

Agradeço aos meus alunos de iniciação científica, João Pedro, Renata e Joana, que me inspiraram, me motivaram e me ensinaram tanto no laboratório. Estão no meu coração!

Agradeço a Grasielle, que ao meu ver é uma grande matriarca no laboratório. Te agradeço pelo companheirismo e pelos sábios conselhos;

Agradeço a Fernandinha que sempre me ajudou e me deu todo apoio nos experimentos com seu *expertise*;

Agradeço a Isabela pela amizade e por ser tão ativa e eficiente no laboratório;

Agradeço a Vívian que ajudou muito a dar certo a parte animal do meu trabalho, mesmo utilizando ‘aquela’ luva amarelada e oxidada.

Agradeço a Amanda por ter me ajudado a aprimorar a ética no ambiente de trabalho.

Agradeço a Pagliara por ser a pessoa mais prestativa e rápida do laboratório.

Agradeço Dani Vale e Camilinha, pela amizade que temos e ajuda na bancada.

Agradeço a todos do LIGP (Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos) por toda ajuda e apoio na execução do meu projeto.

Agradeço também, em especial, as técnicas Vanessa e Michele, por todo auxílio e profissionalismo durante minha temporada no LIGP e a Williane, que me deu todo o suporte.

Agradeço aos laboratórios do Prof. Nelder, da Prof. Santuza, do Prof. Nagem e da Prof. Héliida Monteiro, por terem me ajudado ao compartilhar equipamentos e por terem me recebido sempre tão bem.

Agradeço a todos os meus coleguinhas de corredor e da cantina da Faculdade de Medicina. Vocês sempre me alegram!

Agradeço a todos e espero que eu não tenha esquecido de ninguém. Todos foram muito importantes nessa caminhada.

Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim

dividir um planeta e uma época com todos vocês.

Carl Sagan

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Iniciei a minha carreira científica no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos sob a supervisão do Professor Ricardo Fujiwara (ICB - UFMG). Estava no meu segundo ano da graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura no ICB e naquele momento minha intenção era ser Professora. No início eu havia ido ao laboratório apenas para assistir uma amiga de sala fazer uma PCR convencional, pois eu não conseguia imaginar essa reação complexa acontecendo em um simples “tubo de plástico”. Na época o Doutorando Daniel Menezes precisava de ajuda e me ofereceu um projeto para acompanhá-lo. Aceitei e o acompanhei na execução de boa parte de sua tese “*Estudo de proteínas do parasito Leishmania (Viannia) braziliensis ortólogas a proteínas do hospedeiro: papel na infectividade e potencial uso no diagnóstico sorológico das leishmanioses*”. A experiência foi incrível, descobri uma grande paixão pela rotina de laboratório e aprendi muitas técnicas diferentes. Sou grata por essa experiência e por ter iniciado com o pé direito e com ótimos profissionais ao meu lado.

O Daniel defendeu e iniciou os estudos sob a orientação de outra professora e somado ao falecimento de meu pai, resolvi diminuir a intensidade da minha rotina. Em meu último ano de graduação, fiz estágio como monitora de Bioquímica no ICB para os cursos da área da Saúde. Concluí a graduação com a intenção de seguir a carreira acadêmica; escrevi alguns projetos, mas não consegui orientação para a execução de projetos novos devido à crise econômica. Dessa forma, Daniel me ofereceu um projeto de Mestrado com as condições que ele tinha dentro do laboratório e na área de Imunologia. Esse era meu único requisito, que eu trabalhasse com Biologia Molecular e Imunologia. Na época ele havia se tornado Professor da UFMG e como não podia me registrar naquele momento, pediu ao Professor Eduardo que me registrasse como orientanda. Eu não o conhecia, mas aceitei, confiei e iniciei no Laboratório Multiusuários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, na Faculdade de Medicina. Aceitei e confiei tanto que hoje estou aqui, defendendo minha tese de Doutorado sob a orientação do Professor Eduardo.

No Mestrado, defendi a dissertação intitulada “Avaliação da eficácia protetora induzida pela imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante enolase de *Leishmania braziliensis* contra a infecção causada pela espécie *Leishmania infantum*”. O Mestrado foi uma etapa excelente, pois tive o desafio de iniciar uma padronização de algo que não havia feito antes e em um espaço novo e separado da maior parte do grupo (pois estávamos colonizando um laboratório novo na Faculdade de Medicina). Na minha iniciação com o Daniel, eu tinha acompanhando mais os ensaios de ELISA, PCR quantitativo e experimentos com

animais. No mestrado, tive que padronizar toda a parte de clonagem e expressão de proteínas recombinantes. Fiz predição de epítomos, desenhei primers, estabeleci toda a parte de clonagem no laboratório e várias outras técnicas. Na Faculdade de Medicina, percebi o quanto sou criativa e que sei fazer muito com pouco. Foi maravilhosa a experiência, nada que muita leitura de protocolos, instruções das ferramentas de bioinformática e testes não fossem suficientes para a resolução. Tive a oportunidade de dar aulas na pós graduação e orientar alunos de iniciação científica que me ajudaram bastante no meu projeto, e até mesmo a consolidar o que eu estava aprendendo. Na verdade, eu aprendi junto com eles o tempo todo.

Descobri que amo ensinar e orientar, que amo a rotina de laboratório, que amo ser útil e criativa. Sou enormemente grata ao meu Orientador Eduardo por ter me aceitado e se responsabilizado por mim por todos esses anos. Ele é um grande profissional com o qual desejo manter contato ao longo da minha carreira, admiro e respeito muito a sua trajetória acadêmica e a sua posição na UFMG. Sou grata a todas as oportunidades que me foram dadas também. Dentro do laboratório de Infectologia e Medicina Tropical, eu cresci não apenas profissionalmente, mas também no pessoal.

No Doutorado, eu continuei trabalhando com vacina contra as leishmanioses, porém, dessa vez resolvemos comparar o alvo como vacina de DNA e proteína recombinante e testamos também para testes de diagnóstico. O projeto foi mais desafiador, pois encontrei dificuldades na expressão das proteínas. Todas as proteínas com as quais eu estava trabalhando não apareciam no gel de poliacrilamida. Apareceram apenas no *western blotting* e ainda com peso molecular bem diferente do esperado. Tive ajuda de um segundo grupo, voltei novamente ao laboratório do Professor Ricardo para superar essa etapa e dar continuidade ao meu projeto.

No Doutorado, eu passei por várias questões pessoais muito fortes e que me levaram em paralelo com a pesquisa para um caminho um pouco diferente, mas não distante. São linhas que se cruzam e cruzá-las foi a melhor escolha que fiz. Em 2019, iniciei trabalhos com terapias holísticas. A espiritualidade entrou com toda força na minha trajetória e quando percebi já não conseguia olhar os acontecimentos e as pessoas ao redor da mesma forma. Com muito orgulho, hoje estou me formando também como Consteladora sistêmica/familiar, juntamente com a defesa da minha tese.

“Mas Thaís, como é possível ser cientista e acreditar na espiritualidade, em um Deus?”. Eu pergunto, “e como não?”. A espiritualidade está em tudo, Deus é uma energia e é por isso que Ele é onipotente, onisciente e onipresente. Deus está aqui, falando através de mim, pois sou um canal. Somos espíritos vivendo uma experiência humana na Terra e não o contrário.

Vou para a bancada e não tem experiência melhor do que fazer um experimento e dar certo e quando não dá, me silenciar e ouvir a minha intuição dizendo o melhor caminho.

Respira e ouça seu coração. Todos nós temos intuição e a espiritualidade fala através dela. Te convido a sentar e meditar! Uma vez conectado, você nunca mais será o mesmo, pois já como dizia Einstein *“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”*.

Sou apenas um canal e como canal a minha intenção é, com todas as perspectivas que a espiritualidade tem me proporcionado, continuar na área acadêmica. Desejo agregar muito ainda para os grupos de pesquisa e para a sociedade com tudo que posso fazer de melhor. Eu sei que posso, eu sei que vou e eu sei que consigo! E o Doutorado foi apenas mais uma etapa, a qual eu sou enormemente grata!

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas que afetam regiões mais pobres e menos desenvolvidas no mundo, onde cerca de 380 milhões de pessoas em 98 países se encontram em áreas de risco de infecção e em torno de 2 milhões de casos novos ocorrem anualmente ¹⁻³. A doença afeta, principalmente, as populações da África, Ásia e América Latina, e a patologia está associada a diversos fatores, como a espécie infectante do parasito, o vetor transmissor, fatores sociais e ambientais envolvidos, como desnutrição, e o genótipo do hospedeiro ⁴⁻⁶.

As leishmanioses são importantes em termos de morbidade e mortalidade. Há duas manifestações clínicas principais desse complexo de doenças, a saber: a leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave e fatal da doença e a leishmaniose tegumentar (LT), que abrange os tipos: cutânea (LC), a forma clínica mais comum, mucosa (LM) e cutâneo-difusa (LCD) ⁵. Dos 2 milhões de casos que ocorrem anualmente, cerca de 1,0 a 1,5 milhões são casos de LT, enquanto cerca de 500.000 casos de LV são registrados ³. Em 2017, dos 22.145 casos reportados à Organização Mundial de Saúde (OMS), 20.792 casos ocorrem em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Dados publicados em 2016 mostram que 97 países e territórios eram endêmicos para as leishmanioses. Destes, 65 foram mostrados endêmicos para ambas as formas clínicas da doença, 10 para LV e 22 para LT ^{5,7}. As Figuras 1 e 2 apresentam o estado de endemicidade para as formas visceral e tegumentar da doença.

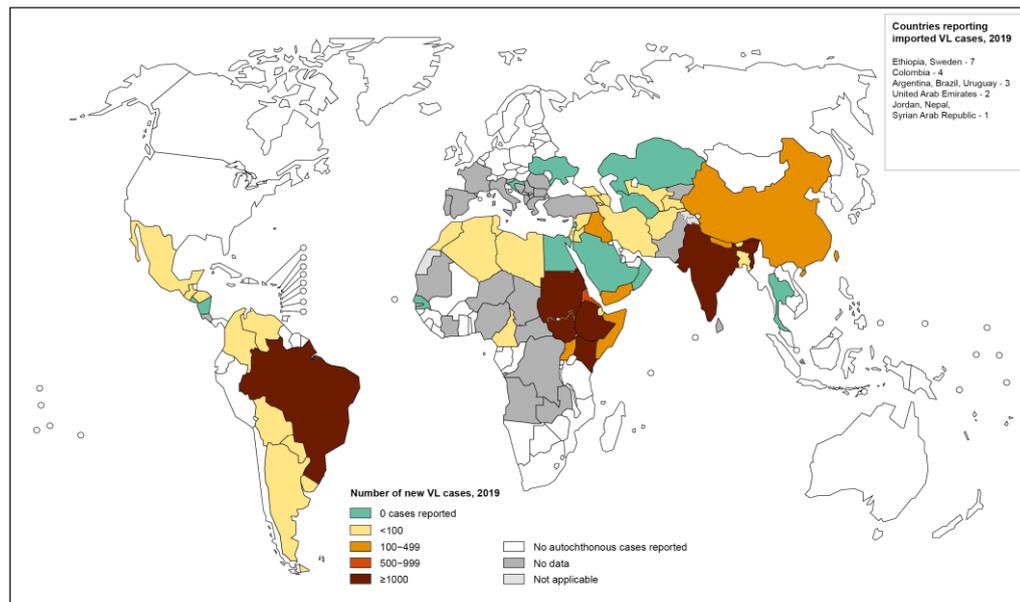


Figura 1. Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo (2019). A maioria dos casos ocorre no Brasil, leste da continente Africano e Sudeste da Ásia. Fonte: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/leishmaniasis-vl-2019.pdf?sfvrsn=a9c1920e_9_7.

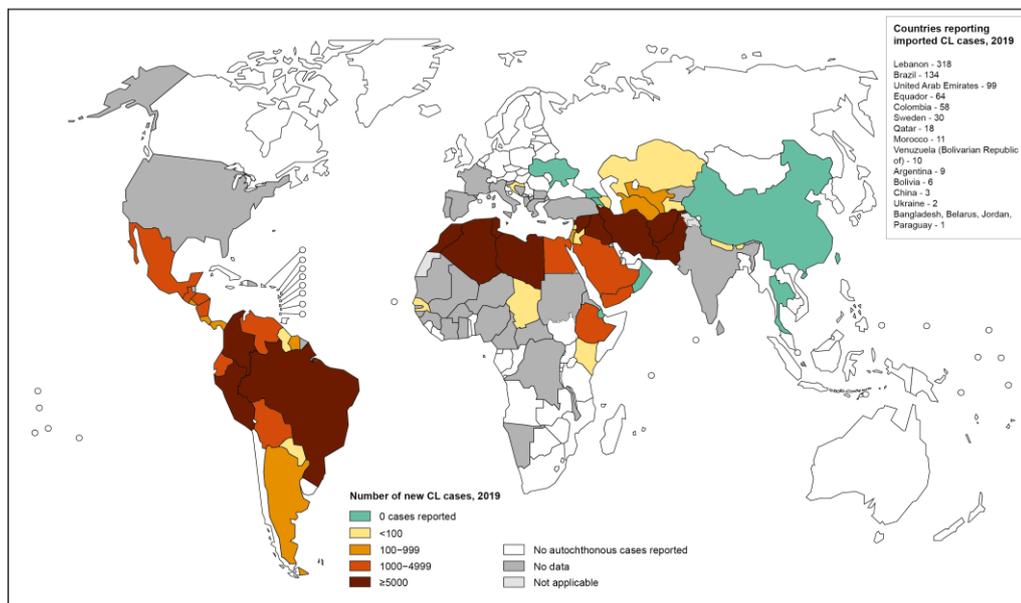


Figura 2. Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo (2019). A maioria dos casos ocorre na América do Sul, Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Fonte: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/leishmaniasis-cl-2019.pdf?sfvrsn=7b1eedab_7_7.

A maioria das pessoas infectadas não desenvolve sintomas rapidamente. Apesar disso, o termo leishmaniose se refere ao fato dos pacientes apresentarem os sinais clínicos da doença e não meramente por apresentar a infecção ^{2,8}. A leishmaniose visceral (LV) é fatal, quando aguda e não tratada, em mais de 95% dos casos. Essa forma da doença é caracterizada pela perda de peso, crises febris irregulares, aumento do baço e fígado e anemia. A maioria dos casos ocorre no Brasil, na África Oriental e no Sudeste Asiático. Estima-se que 50.000 a 90.000 casos novos de LV ocorram em todo o mundo a cada ano, dos quais apenas entre 25-45% são relatados à OMS ^{11,12}.

A LC é a forma clínica mais comum da doença. Os sinais clínicos variam e refletem as diferentes espécies do parasito, estado imunológico e genótipo dos pacientes. A lesão clássica começa com uma pápula ou nódulo no sítio da inoculação com crescimento lento, levando até uma semana para chegar ao tamanho final. Inicia-se o processo de cicatrização na região central por um curto tempo, dando lugar a uma úlcera que cicatriza depois de meses ou anos, gerando também uma pigmentação alterada no local ². Embora a LC esteja associado à baixa mortalidade, ela gera cicatrizes desfigurantes em indivíduos infectados, que na maioria das vezes leva à estigmatização e morbidade do paciente ⁹. Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, Oriente Médio e Ásia Central ^{2,11}.

A LM está presente nas Américas, com a maioria dos casos reportados na Bolívia, Peru e Brasil. A característica mais proeminente das espécies causadores dessa forma de leishmaniose é a capacidade de gerar metástase para as mucosas da boca e do trato respiratório superior pela via linfática ou hematogênica. Situações similares são reportadas por outras espécies em pacientes imunocomprometidos. As lesões nasais são frequentes, com nódulos e infiltração do septo cartilaginoso, levando à obstrução das narinas e subsequente perfuração do septo, com a possibilidade de gerar perda total ou parcial das regiões afetadas. A LM quase nunca cicatriza espontaneamente e infecções bacterianas secundárias são frequentes, sendo a pneumonia intercorrente a causa mais comum de piora da doença ².

Na LCD, as lesões se apresentam como placas e múltiplos nódulos difundidos pelo corpo de pacientes anérgicos ou com alguma deficiência na resposta imune celular aos antígenos do parasito. Por sua vez, na forma disseminada, são inúmeras lesões acneiformes, papulosas e ulceradas que surgem abruptamente (dentro de 24 horas da lesão inicial) dispersas no rosto e pelos membros superiores; lesões na região das mucosas também são comuns. É provável que ocorra a disseminação do parasito pela via hemática ou linfática, uma vez que há outros sintomas associados como febre, dor muscular, anorexia e astenia. A forma recidiva cútis

é caracterizada pela reativação nas bordas ou em áreas próximas da lesão primária dentro de 2 anos após o tratamento ¹⁰.

1.2 ASPECTOS GERAIS DO PARASITO *Leishmania*

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania*. Os parasitos estão classificados na família Tripanosomatidae e na ordem Kinetoplastida, por possuírem um cinetoplasto, estrutura contendo DNA condensado na única mitocôndria da célula ¹¹. Mais de 20 espécies de *Leishmania* são conhecidas por infectarem o homem e a transmissão ocorre pela picada de flebotomíneos fêmeas infectados ^{1,5}.

Os flebotomíneos, também conhecidos como mosquito-palha, são classificados na ordem Diptera, família Psychodidae (subfamília Phlebotominae), que pertencem ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo ¹². Cerca de 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados dos agentes etiológicos responsáveis pelas leishmanioses. Algumas destas espécies de vetores possuem estreita relação com algumas espécies do parasito, bem como seus reservatórios ¹³, conforme é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Hospedeiros e vetores das principais espécies causadoras das leishmanioses no Brasil. A tabela mostra para as três principais formas da doença, suas espécies e diferentes vetores para a infecção em seus hospedeiros silvestres e urbanos. ¹⁴⁻¹⁶.

Hospedeiros e vetores das principais espécies causadoras das leishmanioses no Brasil				
Doença	Agente etiológico	Vetor	Hospedeiro silvestre	Hospedeiro urbano
Leishmaniose tegumentar	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Lutzomyia intermedia</i> <i>Lu. pessoai</i> <i>Lu. wellcomei</i> <i>Lu. whitmani</i>	Roedores	Roedores, equídeos e canídeos (cão)
	<i>Leishmania guyanensis</i>	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. anduzei</i>	Edentados e Marsupiais	-
	<i>Leishmania amazonenses</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i> <i>Lu. olmeca nociva</i>	Roedores	-

	<i>Leishmania lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitalis</i>	Roedores	-
Leishmaniose visceral	<i>Leishmania infantum</i> (<i>chagasi</i> *)	<i>Lu. longipalpis</i>	Canídeos, marsupiais, roedores, edentados	Canídeos (cães)
*Após a descrição como <i>L. chagasi</i> nas Américas, verificou-se que o agente é geneticamente idêntico à espécie <i>L. infantum</i> . Dessa forma, prevaleceu o sinônimo sênior ¹⁷ .				

Uma classificação para *Leishmania* foi proposta com base na combinação de dados moleculares, que dividem as espécies do parasito em duas linhagens filogenéticas principais referidas como seções Paraleishmania e Euleishmania ¹⁸. A seção Paraleishmania inclui *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis* e *L. colombiensis*, bem como o antigo gênero *Endotrypanum*. Desse grupo de espécies de paraleishmania, apenas *L. colombiensis* é considerado patogênico para humanos. A história evolutiva da seção Paraleishmania ainda não foi resolvida e até agora é um clado polifilético dentro do gênero *Leishmania* ¹⁹.

Até recentemente, pensava-se que dentro da grande seção Euleishmania existiam apenas três subgêneros, *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*, este último restrito a infecção em lagartos. Até a descrição de um novo subgênero em 2018, *Mundinia*, que envolve espécies de *Leishmania* responsáveis por causar doença em humanas e animais, *L. (Mundinia) orientalis*, uma espécie recentemente descrita responsável para LC na Tailândia, e *L. (Mundinia) enriettii* e *L. (Mundinia) martiniquensis*, que estavam previamente reunidas ao complexo *L. braziliensis* ²⁰. Essas espécies são transmitidas por dípteros da família Ceratopogonidae. O nome *Mundinia* é uma homenagem aos pesquisadores, Muniz (Mun) e Medina (din), que descobriram e nomearam esses parasitos ²¹.

Os subgêneros mais conhecidos, *Leishmania* e *Viannia*, são caracterizados com base em seu desenvolvimento no intestino dos flebotomíneos. Além do desenvolvimento auxiliar na divisão dos grupos, é evidente uma relação evolutiva entre o parasito e seu hospedeiro invertebrado. O crescimento das espécies do subgênero *Leishmania* é restrito a região anterior ao piloro e ao intestino posterior (desenvolvimento suprapilar); enquanto que para as espécies do subgênero *Viannia* o crescimento ocorre nas três regiões, intestino anterior, médio e posterior (desenvolvimento peripilar e hipopilar) ².

No Brasil, o subgênero *Viannia* (Laison e Shaw, 1987) inclui os agentes responsáveis pela LT, com as principais espécies: *L. braziliensis*, que é o agente causador mais frequente das formas clínicas cutâneas e mucocutâneas; *L. guyanensis*, cuja localização geográfica corresponde ao norte do rio Amazonas e que geralmente causa múltiplas lesões cutâneas; e a *L. lainsoni*, que é limitada quase exclusivamente a Amazônia brasileira. Enquanto que as espécies do subgênero *Leishmania* incluem a *L. amazonensis*, responsável pela forma tegumentar, e a *L. infantum*, causadora da forma visceral no Novo Mundo ¹².

A duração do ciclo de vida do parasito no interior do vetor até se tornar a forma infectante, promastigota metacíclica, varia de acordo com a espécie de *Leishmania* e esse tempo pode ser alterado de acordo com a temperatura, sendo que o desenvolvimento é favorecido com o aquecimento ²². Uma vez que são protozoários digenéticos, os parasitos realizam seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado ²³. O ciclo biológico (Figura 3) inicia-se quando o inseto infectado, com formas promastigotas metacíclicas do parasito – formas afiladas e com flagelo externo para locomoção – ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado para a maturação dos ovos e posterior ovipostura, regurgita essas formas dentro da região dérmica ou dos vasos sanguíneos. Essas formas metacíclicas, ao entrar em contato com o tecido do hospedeiro, infectam fagócitos, principalmente macrófagos teciduais. Nessas células, mais precisamente, dentro dos fagolisossomos, essas formas se transformam em amastigotas – formas ovóides e sem locomoção – que se multiplicam sucessivamente por divisão binária. A proliferação dos parasitos dentro dos fagócitos pode promover o rompimento dessas células ou a formação de corpos apoptóticos, proporcionando a liberação dos parasitos e a infecção de novas células do hospedeiro. Um flebotomíneo não infectado ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro portador ingere, juntamente com o sangue do hospedeiro, essas células infectadas com amastigotas e em seu trato digestivo se transformam em promastigotas novamente, dando prosseguimento ao ciclo (adaptado de ²⁴).

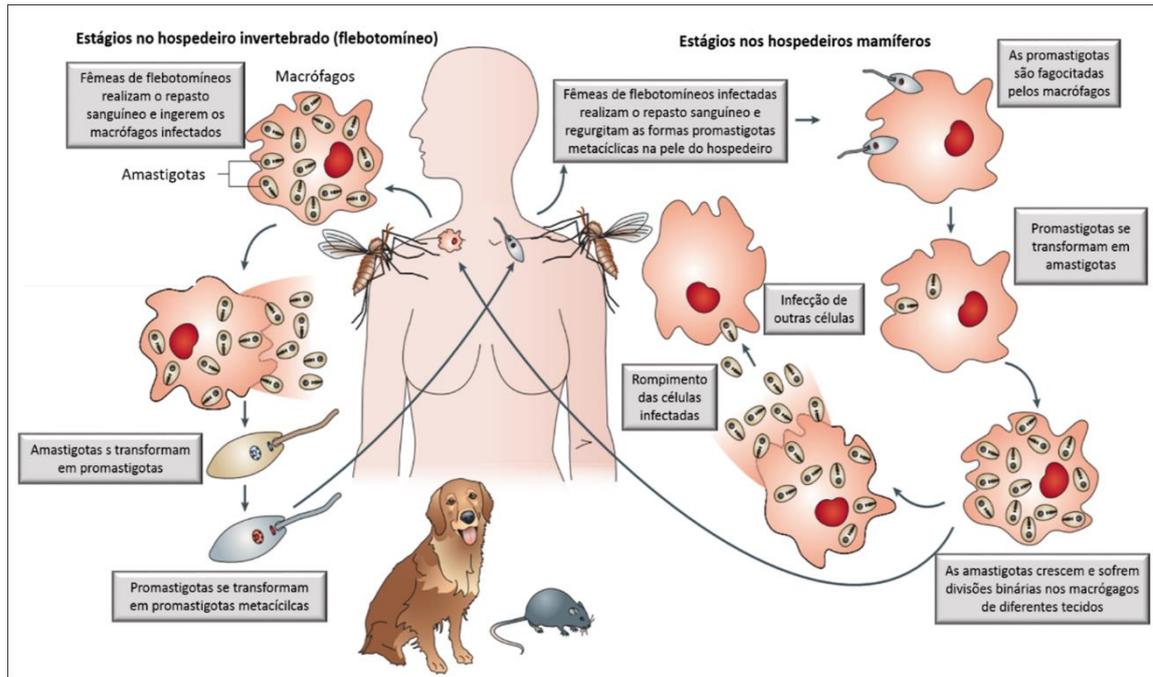


Figura 3. Ciclo biológico do parasito *Leishmania*. O ciclo biológico do parasito é heteroxeno e apresenta o insetor vetor como o hospedeiro invertebrado e o homem e o cão, como os hospedeiros vertebrados (adaptado ²⁴).

A maioria das formas apresentam um caráter zoonótico, em que a infecção é transmitida de um animal reservatório para o humano através de um vetor. No entanto, existem algumas espécies, como *L. tropica* e *L. donovani*, em que o caráter antroponótico é caracterizado pela transmissão de humano para vetor para humano ^{1,24}. O caráter zoonótico ocorre na região mediterrânea e no continente americano, enquanto que o antroponótico apresenta prevalência nos continentes asiático e africano, incluindo Índia, Nepal, Bangladesh e África Oriental ²⁵.

Os habituais hospedeiros que atuam como reservatórios dos parasitos incluem marsupiais, roedores e edentados em ambientes silvestres e, em áreas urbanas, o cão é o principal reservatório ²⁶. No cão, a doença se apresenta de forma sistêmica e crônica, porém, a evolução aguda e grave pode levar o animal ao óbito ²⁷. A doença no cão é classificada com relação aos sinais clínicos e podem ser considerados assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos. A ausência de sinais clínicos caracteriza os assintomáticos, sendo a presença de alguns sinais, como emagrecimento e pelo opaco, como oligossintomáticos. E, por último, os sintomáticos, que apresentam muitos sinais da doença, como alterações cutâneas, alopecia, linfadenopatia, onicogribose, emagrecimento, febre, palidez de mucosas, paresia dos membros posteriores e ceratoconjuntivite ²⁸.

A forma assintomática da doença atinge entre 40 a 60% da população de animais soropositivos ²⁹. Há uma estimativa de que três de cinco cães infectados e assintomáticos transmitem o parasito para os insetos vetores, e essa taxa de transmissão não altera de forma significativa entre os grupos de animais assintomáticos e sintomáticos. Dessa forma, a LV canina (LVC) não é apenas um problema veterinário, uma vez que há uma correlação direta entre a prevalência da doença nos cães e sua incidência no homem ³⁰.

1.3 MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DAS LEISHMANIOSES

O controle das leishmanioses é crucial para a redução da ocorrência da doença em cães e humanos, uma vez que os cães são considerados os principais reservatórios domésticos dos parasitos ³¹. A prevenção e o controle requerem uma combinação de estratégias de intervenção, uma vez que a transmissão ocorre em um complexo sistema biológico envolvendo a tríade: homem, animal reservatório e vetor infectado. As estratégias consideradas chaves para a prevenção são listadas abaixo:

Diagnóstico precoce e tratamento imediato. O diagnóstico precoce pode reduzir a transmissão da infecção entre cães, flebotomíneos e humanos. Desse modo, reduziria a prevalência da doença, incapacitação e morte dos pacientes, além do monitoramento da propagação da doença ^{2,32}.

O **tratamento das leishmanioses** depende de vários fatores, como o tipo de doença, patologias concomitantes e espécies do parasito. As leishmanioses são um conjunto de doenças tratáveis, que requerem um sistema imunocompetente do paciente, porque os medicamentos não eliminam completamente o parasito do organismo, portanto, há risco de recidivas caso ocorra a supressão do sistema imune. Em geral, os pacientes diagnosticados com leishmaniose requerem um tratamento imediato e completo ³³. Os antimoniais pentavalentes foram a primeira classe de medicamentos aplicados ao tratamento das leishmanioses. Gaspar Vianna sugeriu o uso de antimoniais trivalentes para tratar os primeiros casos de LC diagnosticados em São Paulo, em 1914. E em 1922, Bramachari introduziu a uréia estibamina, a primeira de várias pentavalentes mais seguras ². Durante décadas, esquemas de tratamento com antimoniais pentavalentes foram usados como a primeira escolha para tratar a LV em todo o mundo, apesar da via de administração (parenteral), sua alta toxicidade e custo ³². Nos anos 1970, no Quênia, e nos anos 80, em Bihar, na Índia, pacientes com LV começaram a falhar diante do tratamento devido a adaptação de populações resistentes aos antimoniais. A necessidade de medicamentos

mais seguros e eficazes levou à busca de novos compostos, como anfotericina B (lipossomal), pentamidina, miltefosina e paromomicina ².

No Brasil, apenas o antimoniato de meglumina (Glucantime®) – Sanofi-Aventis S.A – está disponível, em conjunto com a anfotericina B, como uma droga alternativa, sendo essa atualmente disponibilizada pelo Ministério da Saúde sob duas formas principais: o desoxicolato de anfotericina B e lipossomal. Apesar da fórmula lipossomal ser eficiente, o seu custo acarreta no uso da formulação mais barata e, conseqüentemente, a mais tóxica (antimoniato de meglumina e anfotericina B). Sendo assim, o uso da anfotericina B lipossomal se restringe apenas aos pacientes que possuem a contraindicação da primeira ³³⁻³⁷. Além disso, o surgimento de cepas resistentes a esses fármacos está aumentando rapidamente em todo o mundo, não induzindo uma cura completa dos pacientes. Portanto, há uma grande necessidade ainda de novas terapias mais seguras e eficazes ³⁷.

Controle do vetor. O controle do flebotomíneo auxilia a reduzir e até mesmo interromper a transmissão da doença. O controle vetorial não é aplicável, pois a maioria dos vetores é silvestre, exceto por algumas medidas de proteção individual, como o uso de mosquiteiros impregnados com inseticida. O uso de inseticidas em redes poderia, concomitantemente, prevenir as leishmanioses e outras doenças transmitidas por insetos vetores, como a malária encefalite japonesa. Porém, as evidências são bastante limitadas de que os mosquiteiros fornecem proteção ^{2,38}.

Sistema de vigilância efetivo. Um sistema de vigilância robusto é um componente essencial dos programas de controle ou eliminação. Esse sistema é importante para monitorar e agir prontamente durante epidemias e situações com altas taxas de letalidade ^{2,33}. No entanto, é claro que os dados oficiais frequentemente subestimam grosseiramente a realidade, devido a vários fatores limitantes: a distribuição descontínua dos focos de transmissão dentro das áreas, podendo apresentar focos separados e amplamente espaçados; doenças negligenciadas e de baixa notificação; grande número de casos sem diagnóstico, diagnosticados de modo errôneo ou sem relato somado a falta de medicação, especialmente quando os indivíduos não possuem acesso ao sistema de saúde; o número de pessoas portadoras e assintomáticas é mais importante em relação ao número real de casos sintomáticos, pois como aponta Hardee (1996), os sintomáticos são apenas a ponta do iceberg ²⁶. Dessa forma, não há dúvidas de que o número de casos que ocorrem ao redor do mundo é consideravelmente maior do que o oficialmente relatado ^{2,39,40}.

Controle de reservatórios. O controle de reservatórios na zona urbana é realizado pela eutanásia de cães portadores das leishmanioses. No Brasil, o Programa de Controle das

Leishmanioses do Ministério da Saúde recomenda a eutanásia dos cães, como uma medida de controle, mas não se faz obrigatória. Apesar de não ser uma medida de saúde pública, em 2016 uma nota técnica, liberada pelo MAPA, autorizou o registro do produto Milteforan no Brasil para o tratamento de cães. O licenciamento foi liberado por ser proibido o tratamento da leishmaniose visceral (LV) com produtos de uso humano e/ou não registrados⁴¹.

Na Europa, os cães são tratados as vezes repetidamente com antimoniais pentavalentes, mas isso não é considerado apropriado, já que a mesma droga é usada para tratar infecções humanas, e pode dar origem a parasitos resistentes a drogas²⁶. Outro agravante é pelo fato de que a maioria dos cães infectados não apresentam os sinais clínicos, ou seja, são assintomáticos e de difícil diagnóstico, apesar de terem um papel significativo na transmissão dos parasitos entre flebotomíneos e humanos^{42,43}.

Como medida profilática temos o uso de vacinas que apresentam uma eficácia na redução da carga parasitária no animal, porém não impedem que o mesmo ainda seja um reservatório da doença⁴⁴; e o uso de coleiras com deltametrina 4%, que apesar de apresentarem resultados eficientes contra *L. longipalpis*, possuem uma função de curta duração e com grandes variações regionais⁴⁵. Desse modo, é notório que essa medida é complexa e deve ser adaptada a situação local³³.

Educação em Saúde. A mobilização social e o fortalecimento de parcerias também é uma medida de controle. Deve ser adaptado localmente um modo eficaz de mobilizar e educar a comunidade com intervenções promissoras para que ocorra efetivamente uma mudança de comportamento. Também se faz importante a busca por parcerias e colaborações com várias organizações e outros programas que atuam no controle de outras doenças transmitidas por vetores³³.

Em uma revisão sistemática analisando a eficácia dos programas de controle da LV que incluiu estratégias para reduzir o risco de transmissão, como controle de reservatório de animais, controle de vetores com pulverização de inseticida, ou uma combinação dessas intervenções, Romero e Boelart (2010) concluíram que faltam evidências científicas para sustentar a eficácia desses intervenções na interrupção da propagação da doença⁴⁶. Um ensaio randomizado de intervenção comunitária, avaliando o impacto da pulverização de inseticidas e a eutanásia dos cães infectados sobre a incidência de infecção humana por *L. infantum*, mostrou que apenas a eutanásia de cães foi capaz de reduzir a incidência em humanos com estimativas de eficácia variando entre 27–52%, dependendo da análise realizada⁴⁷.

Portanto, é possível observar que há várias estratégias para o controle da doença, porém muitas vezes elas são aplicadas incorretamente e inadequadamente avaliadas, e somado a baixa efetividade que elas apresentam, acabam gerando um entrave na redução da doença ²⁶.

1.4 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

O diagnóstico das leishmanioses é complexo mesmo em condições favoráveis, uma vez que os sinais clínicos se confundem com outras doenças como, por exemplo, malária, tuberculose, esquistossomose, paracoccidioidomicose, hanseníase, dentre outras ^{44,48-50}. Faz-se necessário a associação de procedimentos para a obtenção de um diagnóstico acurado. Desse modo, se faz necessário a combinação de sinais clínicos, testes parasitológicos e imunológicos ³³. A apresentação clínica das leishmanioses exhibe polimorfismo e um amplo espectro de sinais e sintomas que podem variar desde as manifestações clínicas discretas (oligossintomáticas), moderadas a graves. É importante destacar que há indivíduos com infecção inaparente e que prever o potencial de evolução clínico desses indivíduos se faz desafiador. Dessa forma, não é indicado o tratamento para esses pacientes, nem a notificação ^{10,51}.

Como métodos de referência para o diagnóstico, temos os testes parasitológicos que se baseiam na demonstração do parasito em amostras de tecido, diretamente por microscopia ou por meio da cultura. Embora o exame microscópico do aspirado do baço seja sensível e específico, ele requer técnica para ler as lâminas com precisão e para realizar a aspiração de modo seguro, sem o desenvolvimento de hemorragia ⁵²⁻⁵⁴. O exame dos aspirados da medula óssea ou dos linfonodos é igualmente específico, porém menos sensível pela baixa parasitemia ^{26,55-57}. Infelizmente, se o primeiro procedimento não identificar os parasitos e o índice clínico de suspeita for alto, é altamente recomendado repetir a amostragem do mesmo local ou de outro local. Já a cultura dos parasitos é periculosa e laboriosa, pois requer um ambiente estéril e um tempo prolongado para obter resultados. Isso limita seu uso em campo ou em centros de saúde periféricos ^{44,54}.

Devido ao alto risco dos exames parasitológicos, os ensaios sorológicos têm sido bastante utilizados para a detecção de anticorpos em amostras de soro humanos e de cães, apesar de não serem tão efetivos na distinção de casos de cura e recidivas, pois os anticorpos permanecem detectáveis mesmo após o tratamento. O teste de anticorpo fluorescente indireto (IFAT), teste de aglutinação direta (DAT), imunocromatografia e ensaio imunoenzimático por ligação enzimática (ELISA) são alguns desses ensaios com diferentes especificidades e sensibilidades ^{26,58,59}.

O DAT e o IFAT utilizam promastigotas inteiras para identificar anticorpos, enquanto o ELISA usa um lisado bruto de promastigotas ou proteínas recombinantes do parasito, que se apresentam mais puras e também bastante utilizadas em testes imunocromatográficos ⁶⁰.

O IFAT mostra sensibilidade de 87% a 100% e especificidade de 77% a 100% ⁶¹. Apesar das formas promastigotas serem os antígenos de escolha para o diagnóstico da LV, essas podem aumentar a reatividade cruzada com outros Tripanossomatídeos, por conta do número de proteínas compartilhadas entre eles ⁶² e a necessidade de um laboratório sofisticado com um microscópio de fluorescência restringe o seu uso para laboratórios de referência ⁶⁰.

O DAT é um teste sorológico aplicável no campo que, em contraste com o teste de ELISA, requer equipamento mínimo e pode ser realizado visualmente. Porém, esse teste necessita de um longo prazo para a leitura e, em comum com muitos outros testes sorológicos, apresenta baixa especificidade com resultados falso-positivos por empregar uma preparação de antígeno baseado em formas promastigotas inteiras ⁵³.

O teste ideal para o diagnóstico sorológico seria aquele de fácil uso, barato e com alta sensibilidade e especificidade. O uso de antígenos brutos e inteiros, utilizados em ELISA, DAT e IFA, para o sorodiagnóstico de doenças tropicais é limitado pelo grande desbalanço entre sensibilidade e especificidade e por ser difícil de se obter uma preparação padronizada. Entretanto, uma vez que um antígeno útil para o diagnóstico tenha sido identificado, técnicas de biologia molecular permitem que esse antígeno seja fabricado como uma proteína recombinante de maneira padronizada e com melhores resultados, vistos em técnicas de imunocromatografia e ELISA ⁵⁷.

O ELISA é amplamente utilizado para o sorodiagnóstico de várias doenças ^{43,63-65}. A sensibilidade e especificidade desses ensaios são influenciadas grandemente pelo antígeno empregado. Vários antígenos, incluindo proteínas recombinantes purificadas (dp72, gp70, rK39 e HSP70), foram testados, mas o antígeno bruto solúvel ainda é amplamente utilizado, apesar de apresentar reações cruzadas com outros patógenos ^{53,66-70}. Além disso, muitos desses candidatos são proteínas conservadas, ou seja, apresentam uma alta similaridade nas sequências aminoacídicas com proteínas humanas e / ou caninas, dificultando a aplicabilidade dos testes ⁷¹. Portanto, tem-se buscado antígenos que são formados por regiões aminoacídicas únicas de *Leishmania*, que não apresentem homologias de epítomos com seus hospedeiros e que substituam o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) como, por exemplo, as proteínas recombinantes rkE16, rk26, rK39 e A2 ⁷²⁻⁷⁴.

Por sua vez, o teste imunocromatográfico, também utilizado para detectar anticorpos específicos ao parasito, tem-se tornado promissor devido a sua simplicidade e facilidade de uso ⁷⁵. A identificação de novos antígenos purificados, como a proteína recombinante K39 (rK39), tem sido extensivamente estudada e aplicado para uso em testes rápidos. O rK39 é composto por repetições de um resíduo de 39 aminoácidos (k-39), codificado por um gene relacionado à cinesina nas formas amastigotas de *L. infantum*, sendo bastante utilizado para o diagnóstico da forma visceral, pois é altamente conservado entre as espécies viscerotrópicas, o que limita seu uso para a forma visceral da doença ^{76,77}.

O Ministério da Saúde disponibilizou duas opções para o diagnóstico, o teste rápido KALAZAR DETECT® (InBios International, Seattle, WA) que utiliza amostras de soros e o teste de imunofluorescência (IFI-LH®-Leishmaniose Humana - Biomanguinhos, Fiocruz, Brasil) produzido no Brasil. Ambos aplicados para o diagnóstico da LV ⁷⁸. O IFI apresenta sensibilidade e especificidade de 88% a 92% e 83% a 88%, respectivamente, e apresenta como vantagem a larga produção, porém, requer infraestrutura laboratorial de média complexidade e profissionais especializados para a realização do exame ^{79,80}. O Kalazar Detect é simples, de fácil interpretação e apresenta uma sensibilidade, entre 84% a 88%, e especificidade de 91% ^{81,82}. Em 2015, o Ministério da Saúde substituiu o Kalazar Detect pelo teste rápido IT-LEISH®, produzido pela Bio-Rad Laboratories, USA, por apresentar resultados de sensibilidade e especificidade superiores ao kalazar detect (sensibilidade de 92% a 93% e especificidade de 92% a 98% ^{80,81}) e por permitir a análise de amostras de soro, plasma e/ou sangue total, facilitando assim o seu emprego nos serviços de atenção primária ⁸³. Além disso foi uma medida economicamente apropriada ⁷⁸.

Diante de vários métodos de diagnóstico, é importante analisarmos as limitações que esses testes ainda apresentam frente as diferentes formas das leishmanioses e as condições após o tratamento da doença. Analisando os métodos empregados para identificar as leishmanioses é interessante notar que para a forma visceral da doença há antígenos já estabelecidos para o sorodiagnóstico, como o rK39 empregado em elisas e em testes rápidos; enquanto que para a forma tegumentar ainda não há um consenso na aplicação desses antígenos, uma vez que os pacientes apresentam uma baixa parasitemia, gerando uma baixa produção de anticorpos. Desse modo, pacientes com a forma tegumentar podem ser classificados como falso-negativos ⁷¹. Outro aspecto agravante ao se diagnosticar, são os pacientes tratados, uma vez que a resposta humoral pode permanecer mesmo após a cura da doença. Dessa forma, a diferenciação desses pacientes, tratados e não tratados, ainda se apresenta como um obstáculo devido à reatividade humoral ^{26,58}.

Na década de 1990, surgiram como alternativa os testes moleculares para a detecção do DNA do cinetoplasto ou ribossomo pela reação em cadeia da polimerase (PCR), aumentando bastante a sensibilidade e permitiu o diagnóstico de espécies em amostras de tecidos e sangue ^{2,54}. Estudos mostram que a PCR apresentou um aumento da especificidade de 100% nos testes para a forma cutânea, e um aumento na sensibilidade de 20 para 30% quando comparado ao teste parasitológico convencional. O mesmo é visto para os casos de mucocutânea ⁸⁴. No entanto, além de ser uma técnica que precisa da presença desses parasitos nos tecidos utilizados, um entrave para o diagnóstico da forma tegumentar da doença, é onerosa, necessita de uma equipe treinada e apresenta resultados que dependem de algumas variáveis envolvidas, como o tipo de amostra processado, área endêmica, o alvo do DNA usado para amplificação, entre outros ⁸⁵.

Desse modo, é possível notar que o diagnóstico da LT humana é limitado ao exame parasitológico (exame direto por microscopia e/ou isolamento do parasito em meios de culturas). Apesar de haver um antígeno eficaz e empregado em testes sorológicos (IFI e ELISA) e cromatográficos para a LV, como rK39, e alternativas mais eficientes como a qPCR, ainda se faz necessários exames mais específicos, baratos e de fácil aplicabilidade ^{64,86}. Conseqüentemente, novos alvos proteicos tem sido testados ^{69,71,87} com o objetivo de melhorar o diagnóstico, visando uma alta sensibilidade de modo a conseguir identificar a forma tegumentar da doença, e uma alta especificidade para que o alvo possa ser utilizado no diagnóstico correto da forma visceral e também como controle de cura.

Semelhante ao diagnóstico humano, o diagnóstico clínico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública devido à similaridade dos sinais clínicos com outras patologias, alterações histopatológicas inespecíficas e a inexistência de testes 100% específicos e sensíveis ^{88,89}. O diagnóstico laboratorial em cães é semelhante ao realizado em humanos, se baseando nos exames parasitológico e/ou sorológico. O diagnóstico parasitológico se baseia na visualização direta do parasito em material biológico, como punções hepática, esplênica, de medula óssea, de linfonodos e biópsia de pele. Apesar de ser 100% específico, são métodos invasivos, de sensibilidade bastante variável devido ao grau de parasitemia do animal, demorados e, conseqüentemente, impraticáveis em programas de saúde pública. O Ministério da Saúde tem recomendado para o diagnóstico sorológico o RIFI (título de 1:40 ou mais) e ELISA (considerado positivos os valores da densidade óptica igual ou superior a 3 desvio-padrões do cut-off do controle negativo).

Apesar dos testes sorológicos serem o método mais utilizado para cães, eles apresentam limitações pela possibilidade de gerarem reatividade cruzada com outras doenças

causadas por outros tripanossomatídeos, como o *Trypanosoma cruzi*, e com protozoários de outras famílias, como *Babesia canis*, ou até mesmo com a bactéria *Ehrlichia canis*⁹⁰, e podem não diferenciar cães naturalmente infectados de cães vacinados⁹¹.

Além disso, a maioria dos cães infectados permanece assintomático por longos períodos e com uma baixa carga parasitária, implicando na falta de reconhecimento dos parasitos nos testes parasitológicos ou sorológicos⁹². Como consequência, métodos de diagnóstico que buscam identificar ambos, assintomáticos e sintomáticos, têm sido desenvolvidos, uma vez que animais infectados possuem um papel relevante na transmissão do parasito para outros cães saudáveis e humanos^{93,94}.

1.5 RESPOSTA IMUNE

Dependendo da natureza do patógeno que induz a resposta inicial no hospedeiro, a célula dendrítica ativada, com a liberação específica de citocinas chave, direciona a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ *naives*, virgens de exposição, em tipos distintos de células efetoras, podendo ser principalmente diferenciadas nos subtipos Th1, Th2 ou Th17⁷⁴. O perfil de resposta associado à proteção do hospedeiro contra a LV é determinado pelo maior balanço do subtipo Th1, caracterizado pela produção das citocinas IFN- γ , IL-12, TNF- α , GM-CSF, dentre outras. Essas citocinas atuam como uma alça de retroalimentação positiva no aumento da polarização da resposta para o perfil Th1, atuando nas células T CD8⁺, o que aumenta a sua atividade citotóxica, e também na resposta humoral dependente de T, uma vez que atuam na ativação dos linfócitos B em plasmócitos secretores de anticorpos mais específicos, sendo IgG2a a subclasse prevalente⁹⁵. Elas também atuam com retroalimentação positiva na ativação da via clássica dos macrófagos, induzindo-os a aumentar a expressão de enzimas ligadas a síntese de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, responsável pela morte dos parasitos internalizados⁹⁶. Esse repertório imune é encontrado em pacientes assintomáticos, ou seja, aqueles que conseguem controlar a infecção sem o avanço da doença⁹⁷.

Já a doença aguda apresenta como repertório imune maior balanço de citocinas do subtipo Th2, como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β . Essas moléculas atuam como alça de retroalimentação positiva no aumento da polarização do perfil Th2, na ativação de linfócitos B em plasmócitos secretores de anticorpos específicos como IgE e IgG1 e que possuem um papel na defesa mediada por eosinófilos e mastócitos⁹⁵. As citocinas também desencadeiam a ativação alternativa dos macrófagos, os induzindo a expressar enzimas ligadas a síntese de colágeno e fibronectina, ou seja, um processo relacionado a fibrose e remodelagem tecidual.

Desse modo, o sistema imune não consegue combater o parasito e reduzir a carga parasitária, propiciando o agravamento da infecção ^{75,76}. A suscetibilidade do modelo murino à infecção por *Leishmania* é crucial para a identificação da dicotomia das respostas Th1/Th2, ainda que uma área de contínua especulação e investigação ainda permanece ^{1,24}. Ademais, avanços na compreensão da progressão das leishmanioses indicam que as interações celulares são mais complexas do que o paradigma de balanço Th1/Th2 na definição do curso da infecção ⁶.

O papel das células Th17 tem se apresentado como um modulador crucial da imunidade adaptativa contra parasitos *Leishmania*. A diferenciação das células Th17 é mediada pela ativação de células T *naive* na presença da combinação das citocinas TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23. A citocina IL-17 coopera com outras do perfil, como IL-17, IL-21 e IL-22, auxiliando na indução da inflamação do tecido ao ativar a iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e induzir a expressão do fator estimulador de colônias de granulócitos, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e várias quimiocinas para potencializar a inflamação ⁹⁸. A indução desses mediadores inflamatórios sugere que a IL-17 tenha um papel importante nas infecções por parasitos intracelulares, atuando em sinergismo com o perfil Th1, ou seja, potencializando o perfil protetor contra a LV. Embora muitos trabalhos tenham discutido as respostas imunes celulares contra as diferentes formas de leishmaniose ^{99,100}, o papel de Th17 na imunopatogênese e no controle das leishmanioses permanece ainda a ser melhor definido ¹⁰¹.

1.6 VACINAS CONTRA AS LEISHMANIOSES

A busca de vacinas contra as leishmanioses é importante para o controle e prevenção da doença. Vários antígenos de *Leishmania* têm sido explorados como candidatos a vacinas promissoras, podendo ser administrados de diferentes formas: como o parasito *Leishmania* íntegro e inativado ou atenuado, chamados de vacinas de primeira geração; como subunidades, as proteínas de *Leishmania* classificadas como vacinas de segunda geração; e com o uso de vacinas de DNA como as vacinas de terceira geração ²⁵. Vários estudos utilizando os três tipos de vacinas têm demonstrado sucesso na proteção contra a LV em estudos *in vivo* ¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Datta et al. (2012) investigaram a eficiência imunoproliférica de parasitos da espécie *L. donovani* atenuados por radiação gama na infecção experimental de camundongos BALB/c com a forma visceral da doença. Os parasitos atenuados por radiação se mostraram significativamente eficazes na proteção de camundongos contra a infecção após duas doses em

um intervalo de tempo de 15 dias, o que foi ainda confirmado pelo aumento da resposta imune Th1 em detrimento da resposta Th2 ¹⁰⁵.

Apesar das vacinas de primeira geração apresentarem algum nível de proteção contra as leishmanioses, elas apresentam limitações ao gerar resposta imune, devido à grande variabilidade na sua produção e também por sua toxicidade, uma vez que é vista como insegura para uso da população ^{25,103,106,107}. Além disso, os regulamentos de vacinas e os critérios de liberação atuais fazem com que esse tipo de vacina não represente mais uma opção sustentável e viável para uso generalizado ¹⁰⁸.

A revolução da engenharia genética no final do século 20 impactou bastante o desenvolvimento de alvos vacinais, surgindo assim as vacinas de segunda geração, que incluem proteínas de *Leishmania* purificadas, bem como proteínas recombinantes do parasito ²⁵. Essas vacinas têm demonstrado uma melhor resposta imunológica, em relação as de primeira geração, as quais levaram o sucesso de algumas vacinas que passaram e/ou estão no mercado.

Atualmente, existem três vacinas disponíveis para prevenção da LVC. A vacina CaniLeish® (Virbac, França), produzida a partir de antígenos da *L. infantum* (LiESP/QA-21), não é encontrada no mercado brasileiro, mas é utilizada por alguns países da Europa. Essa vacina apresentou eficácia na prevenção dos sinais clínicos em cães de cerca de 68,4%, com um nível de proteção de 92,7% e é bastante tolerada pelos animais, nos quais o maior evento adverso se apresenta como um leve inchaço local associado a dor no local da injeção ¹⁰⁹. Apesar de induzir uma resposta imune mediada por células T do subtipo Th1, importante para o combate ao parasito, ela não tem um caráter preventivo, mas sim terapêutico, pois ela não previne o cão da infecção primária pelo protozoário, apenas controla a carga parasitária no animal ¹¹⁰ e o avanço de sinais clínicos graves. Assim, ela pode ser administrada antes ou após a infecção.

No Brasil, temos duas vacinas que foram aprovadas em 2014 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA): Leishmune® (Zoetis, Campinas, Brasil) e Leish-Tec® (Hertape S.A., Juatuba, Brasil). A Leishmune® foi produzida a partir de uma fração glicoproteica purificada de *L. donovani* associada ao adjuvante saponina. Seu uso foi suspenso no mesmo ano pelo MAPA em conjunto com o Ministério da Saúde, por não apresentar os requisitos da avaliação de um ensaio clínico de Fase III ⁵². Já a Leish-Tec® se encontra atualmente no mercado e foi produzida a partir da proteína recombinante A2 de *L. infantum* associada ao adjuvante saponina. A vacina apresenta 71% de eficácia e 43% na redução da transmissibilidade em estudos de fase III ⁴⁴.

As vacinas de terceira geração, que utilizam um vetor plasmidial para a inserção de genes que codificam proteínas de interesse nas células do hospedeiro, podem ser usadas contra patógenos intracelulares ao estimularem uma resposta celular dos tipos CD4 e CD8¹¹¹. Essas vacinas de terceira geração têm demonstrado bastante eficiência com diferentes candidatos vacinais com as diferentes formas clínicas da doença, como têm sido demonstrado por vários estudos que utilizaram diferentes antígenos, como LACK¹¹², NH36¹¹³, proteínas cinases¹¹⁴ e HASPB¹¹⁵. Nesse contexto, o uso de vacinas de DNA tem demonstrado ser uma alternativa interessante devido à sua capacidade de indução de imunidade celular prolongada, pelo menor custo de produção de tais vacinas, além da maior estabilidade de conservação.

Embora pesquisadores tenham centrado esforços nas tentativas de encontrar uma alternativa eficiente para a prevenção da LV, até o momento não há vacina disponível para o ser humano e ainda nenhuma vacina disponível para cães tem se apresentado altamente eficaz no controle da doença^{53,54}. A busca por alvos vacinais persiste, principalmente, por aqueles antígenos imunodominantes, que desencadeiam resposta do tipo Th1 e se apresentam conservados entre as espécies causadoras das leishmanioses, de forma a apresentar um amplo espectro de proteção^{55,56}.

Desse modo, muitos estudos têm buscado esses antígenos vacinais através da imunoproteômica¹¹⁶⁻¹¹⁸, uma técnica que combina o *western blotting* com a proteômica⁵⁶. Essa abordagem é bastante utilizada atualmente, além de outros fins, para a identificação de proteínas antigênicas e imunogênicas de *Leishmania* para posterior avaliação do seu potencial como candidato diagnóstico ou vacinal contra as leishmanioses⁵⁸⁻⁶⁰.

A imunoproteômica tem se mostrado uma ferramenta promissora e eficiente para seleção de antígenos a partir de diferentes patógenos, que podem apresentar propósitos vacinais, diagnóstico e/ou terapêuticos¹¹⁶⁻¹¹⁸. Nosso grupo tem utilizado essa abordagem na busca por alvos vacinais e diagnósticos para as leishmanioses, que têm apresentado resultados promissores, como as proteínas: piridoxal cinase, enolase, SMP-3, proibitina, β -tubulina e dentre várias outras de função ainda desconhecidas, denominadas de hipotéticas^{104,119-126}. E com o objetivo de otimizar a eficiência desses antígenos diferentes, encontrados e testados, atualmente o grupo tem utilizado as regiões de domínio contendo apenas os epítomos relevantes de cada proteína, de reconhecimento pelos linfócitos B e T, na junção e construção de proteínas quiméricas¹²⁷⁻¹²⁹.

Recentemente, nosso grupo realizou um ensaio de imunoproteômica feito com as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, que identificou possíveis alvos antigênicos quando esses foram reconhecidos por anticorpos presentes em soros de pacientes portadores de

LV, em detrimento ao não reconhecimento por anticorpos encontrados em indivíduos sadios¹³⁰. Dentre eles, a proteína fator eucarioto de alongamento 1 beta de *Leishmania* (EF1 β ; LINF_340014000) foi selecionada para ser testada no presente trabalho. Além disso, a proteína apresenta epítomos preditos de linfócitos B e células T dos subtipos CD4⁺ e CD8⁺. Dessa forma, a proteína se apresenta como um alvo potencial para o diagnóstico e vacina para as leishmanioses.

A proteína EF1 β é considerada crucial para o processo de tradução proteica em eucariotos e archaea. A tradução da informação genética do DNA para proteínas é realizada pela maquinaria dos ribossomos por meio das ligações peptídicas e é dividida em quatro diferentes fases: (1) a fase de iniciação dirigida pelos códons de partida no mRNA e fatores de iniciação (IFs), em que as subunidades ribossomais são montadas e os tRNA iniciadores se ligam ao ribossomo; (2) a fase de alongamento, na qual os códons no mRNA são combinados nos tRNAs sob o controle estrito dos fatores de alongamento (EFs); (3) a fase de terminação, durante a qual os códons de parada são reconhecidos pelos fatores de liberação (RFs) e os polipeptídeos sintetizados são liberados do ribossomo; e (4) a fase de reciclagem, na qual as subunidades ribossomais são dissociadas umas das outras sob a influência de um fator de reciclagem de ribossomos (RRF)¹³¹. O fator de alongamento EF1 β (também conhecido como EF-Ts ou EF-1 beta / gama / delta) é um fator de troca de nucleotídeos necessário para regenerar EF1 α de sua forma inativa (EF1 α -GDP) para sua forma ativa (EF1 α -GTP). O EF1 α interage com um novo aminoacil-tRNA para iniciar o ciclo novamente. O EF1 β é mais complexo em eucariotos do que em bactérias e pode consistir de três subunidades: EF1 β -beta (ou EF-1 beta), EF1 β -gama (ou EF-1 gama) e EF1 β -delta (ou EF-1 delta). Sendo assim, o EF1 é um domínio de troca de nucleotídeos de guanina encontrado nas cadeias beta e delta dos fatores de alongamento de eucariotos e archaea^{131,132}.

No presente estudo, o gene codificador da proteína EF1 β foi clonado e a proteína foi expressa e purificada na forma recombinante para ser utilizada em testes vacinais e de diagnóstico sorológico para as leishmanioses. Ensaio de ELISA para o sorodiagnóstico da LV canina e humana, bem como para a LT humana, foram realizados. Como alvo vacinal, a proteína foi administrada como vacina de DNA ou proteína recombinante mais saponina, um glicosídeo proveniente do metabolismo secundário vegetal muito utilizado por induzir um perfil de resposta Th1 nos modelos animais para as leishmanioses¹³³⁻¹³⁵, e a eficácia protetora dos imunógenos foi avaliada em modelo murino contra a infecção com *L. infantum*.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, os métodos de diagnóstico para detecção das leishmanioses canina e humana são baseados em testes parasitológicos convencionais e moleculares e testes imunológicos. Assim, uma variedade de métodos tem sido aplicada para a detecção de cães e humanos portadores do parasito. Entretanto, eles apresentam variável sensibilidade para a detecção dos casos com baixa carga parasitária ou títulos de anticorpos antileishmaniais, além de variável especificidade para a discriminação dos casos de leishmanioses daqueles desenvolvidos por outras espécies de Tripanosomatídeos.

Assim, é possível observar que há estratégias para o controle das leishmanioses, porém muitas vezes elas são aplicadas inadequadamente, e somado à baixa efetividade que apresentam, acabam gerando entrave na redução da incidência da doença. Como consequência, novos estudos têm buscado identificar antígenos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da doença, além do desenvolvimento de novas vacinas, que se apresentam também como medida de controle da doença, uma vez que há poucas vacinas disponíveis para cães no mercado, e que apresentam eficácia controversa, e não existe uma vacina disponível para humanos ¹³⁶.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo principal buscar um novo alvo para futuro emprego como vacina e no diagnóstico das leishmanioses, de modo que o mesmo possa ser empregado com eficácia profilática e/ou na melhoria da sensibilidade e especificidade para composição de um teste laboratorial efetivo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a proteína fator eucarioto de alongamento 1 beta de *Leishmania* (EF1 β) como candidata ao diagnóstico imunológico e como vacina contra as leishmanioses.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Identificar epítomos específicos de linfócitos B e T na sequência da proteína EF1 β de *L. infantum* e verificar sua conservação entre diferentes espécies do parasito *Leishmania* e de outros Tripanosomatídeos;
- ❖ Clonar o gene codificador da proteína EF1 β , expressar e purificar a proteína recombinante e avaliar seu desempenho diagnóstico para detecção da LV canina e humana, além da LT humana, usando amplo painel sorológico.
- ❖ Avaliar a eficácia prognóstica da proteína usando soros de pacientes coletados antes e após o tratamento e cura clínica;
- ❖ Avaliar a imunogenicidade e eficácia protetora da proteína rEF1 β administrada na versão recombinante mais saponina ou como vacina de DNA em camundongos BALB/c contra a infecção usando *L. infantum*, por meio de avaliações imunológicas e parasitológicas.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com o objetivo de melhor visualizar as etapas do projeto, um planejamento da pesquisa é mostrado abaixo:

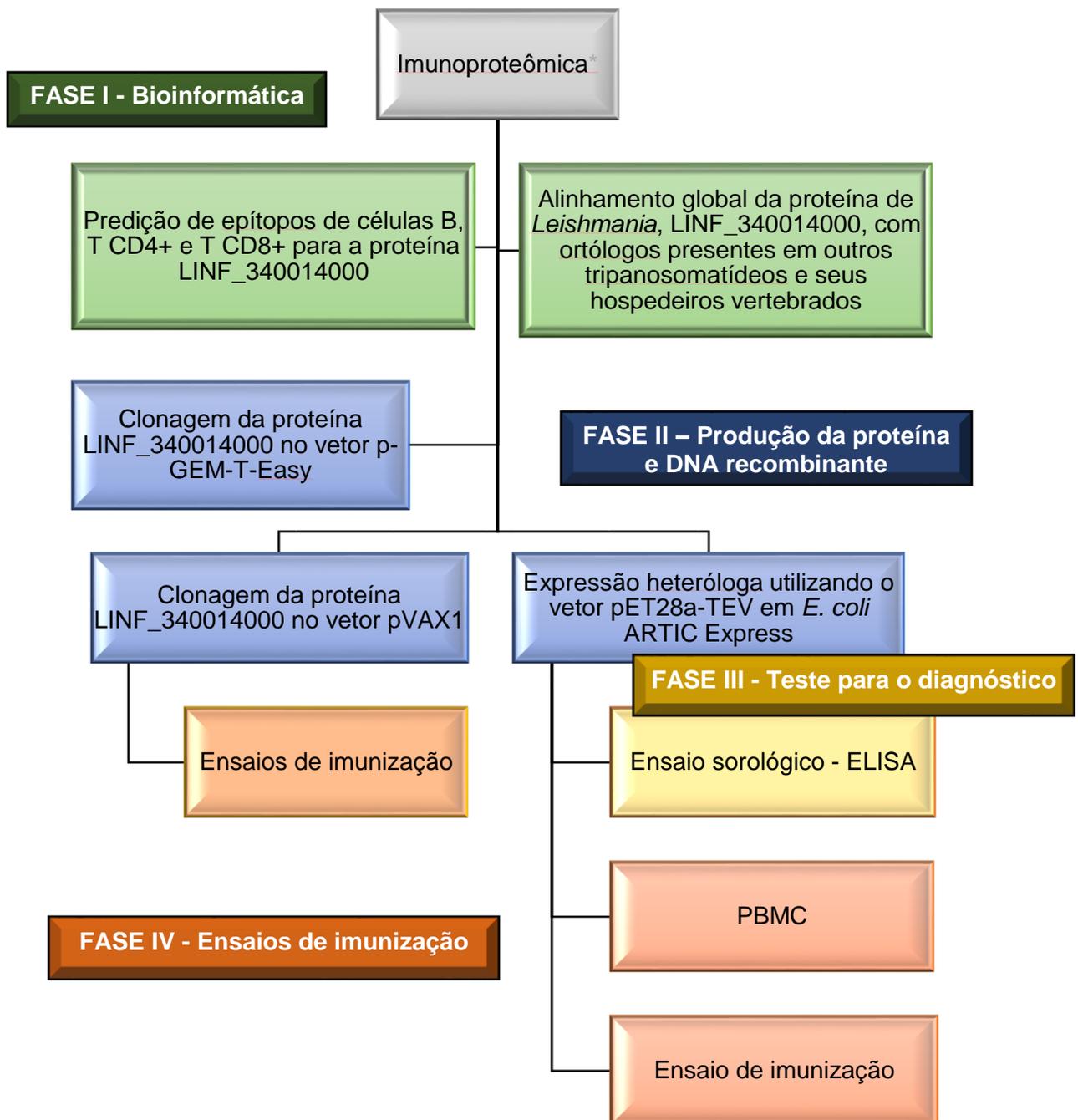


Figura 4. Delineamento experimental geral.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A experimentação animal usando a proteína rEF1 β foi realizada de acordo com o esquema abaixo:

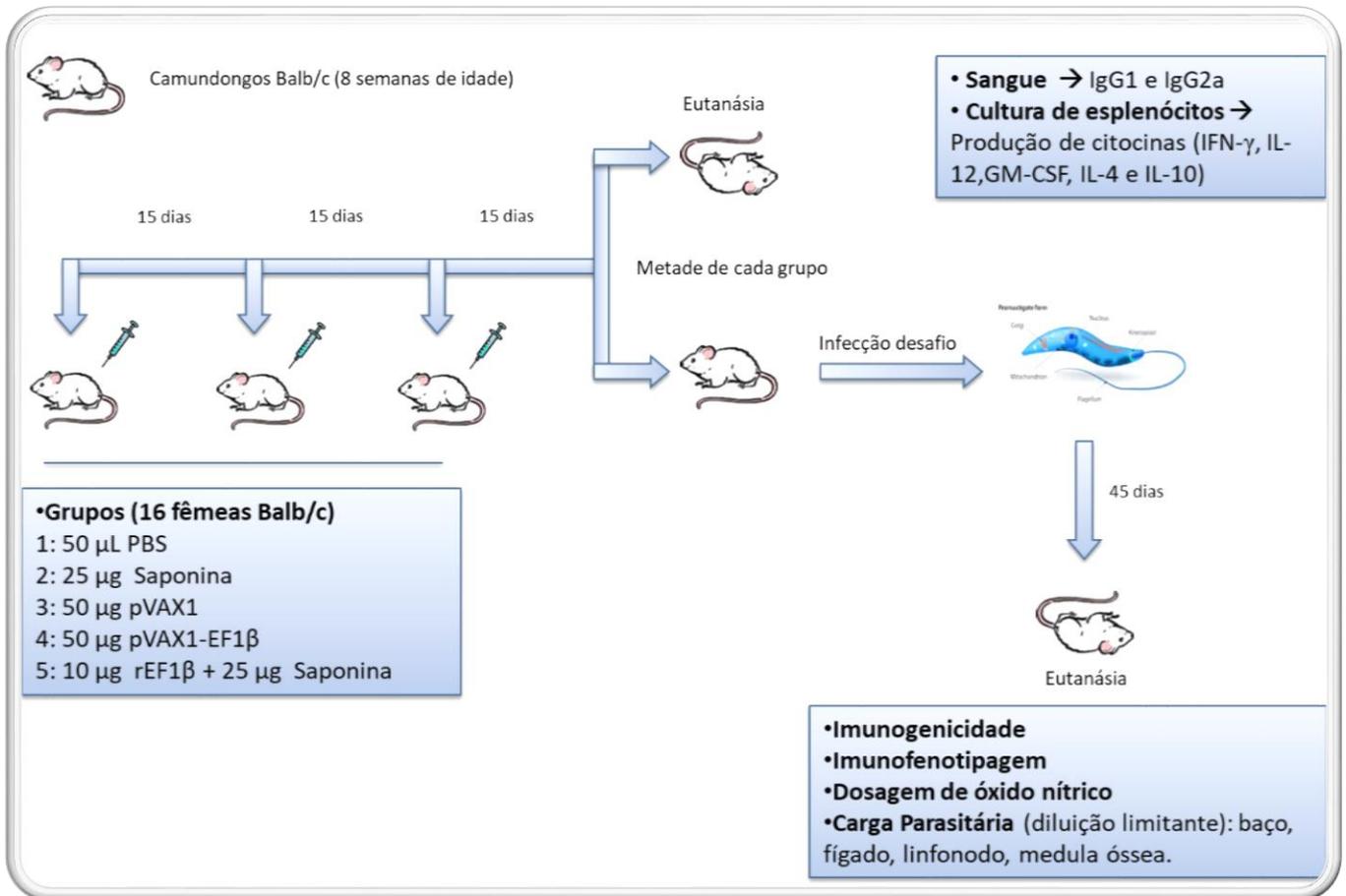


Figura 5. Delineamento da experimentação animal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 FASE I – BIOINFORMÁTICA

5.1.1 Seleção da proteína de *Leishmania candidata* ao diagnóstico e vacina

A proteína utilizada no trabalho foi selecionada por meio da técnica de imunoproteômica utilizando extrato proteico de *L. infantum*¹³⁰. Essa proteína foi reconhecida por anticorpos presentes nos soros de pacientes com LV, em detrimento do não reconhecimento por anticorpos presentes em pacientes portadores de outras doenças que podem gerar reação cruzada e indivíduos sadios.

5.1.2 Predição de epítomos

As predições de epítomos foram realizadas a partir da sequência de aminoácidos da proteína EF1 β (LINF_340014000).

5.1.2.1 Linfócitos B

Epítomos de linfócitos B foram preditos utilizando o programa *BepiPred-2.0 server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/index.php>)¹³⁷. Este programa prediz epítomos a partir da sequência proteica, usando o algoritmo *Random Forest* treinado com aminoácidos sabidamente formadores e não formadores de epítomos determinados por cristalografia. Os dados foram gerados a partir de um cut-off de 0.6 para EF1 β , que confere uma especificidade de 95% e uma sensibilidade de 10%.

5.1.2.2 Linfócitos T CD4⁺

Peptídeos ligantes as moléculas de MHC de Classe II (MHC-II) foram preditos pelo programa *NetMHCIIpan 3.2 server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>)¹³⁸. As predições são disponíveis para os três isotipos de MHC-II em humanos, HLA_DR, HLA_DP e HLA-DQ, bem como para as moléculas H-2 presentes em camundongos. Os valores de predição são dados pelo IC₅₀ (nM) e classificação em porcentagem. A porcentagem para um determinado peptídeo é dada pela comparação da sua pontuação com a de outros 200.000 peptídeos naturais aleatórios, sabidamente ligantes ao MHC-II e com o mesmo comprimento configurado no programa. Ligações fortes e fracas são identificadas baseadas na classificação em porcentagem e com limites ajustáveis (*threshold*). Dessa forma, o programa foi utilizado para a predição de

epítomos de 15 aminoácidos, utilizando os isotipos apenas de humanos, com a classificação de 2% para o *threshold* de ligantes fortes, e com 10% para o *threshold* de ligantes fracos.

5.1.2.3 Linfócitos T CD8⁺

Peptídeos ligantes as moléculas de MHC de Classe I (MHC-I) foram preditos utilizando o programa *NetCTL 1.2 server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>)¹³⁹. Este preditor é baseado em redes neuronais artificiais para a predição de epítomos de linfócitos T citotóxicos (CTL) a partir de sequências proteicas. Esta última versão atualizada (1.2) foi treinada com 886 ligantes conhecidos de MHC de Classe I (MHC-I) restritos a 12 supertipos diferentes presentes em humanos. O método integra uma junção de características probabilísticas além da ligação ao MHC-I, bem como a clivagem C terminal via proteassoma e a eficiência do transporte via TAP (transportador associado ao processamento de antígeno). As pontuações das três predições individuais são integradas como uma soma ponderada, com um peso relativo na ligação MHC-I / peptídeo de 1. Diferentes *thresholds* são atribuídos para as pontuações integradas, sendo traduzidos em valores de sensibilidade / especificidade. O programa foi executado com o *threshold* de 1.0, ou seja, cerca de 70% de sensibilidade e 99% de especificidade, para os supertipos – A2, A3 e B7.

5.1.3 Alinhamento de proteínas homólogas

Um BLAST foi realizado no banco de dados TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>), com espécies de tripanosomatídeos causadores das leishmanioses e doença de Chagas, que apresentavam homologia e sintonia gênica com os candidatos selecionados neste trabalho. Proteínas homólogas correspondentes nos hospedeiros vertebrados (*Canis familiaris* e *Homo sapiens*) para os parasitos do gênero *Leishmania* foram obtidas através do BLAST no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A proteína foi alinhada e as porcentagens de identidade entre as proteínas foram obtidas utilizando o programa *ClustalW* (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)¹⁴⁰. As regiões com homologia no alinhamento múltiplo foram sombreadas, usando o programa BoxShade 3.21 (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). As regiões de domínio das proteínas foram encontradas utilizando a base de dados de família de proteínas Pfam (<https://pfam.xfam.org/>). As sequências utilizadas no alinhamento múltiplo da proteína EF1β foram: LINF_340014000 (*L. infantum* JPCM5); LdCL_340014200 (*L. donovani* CL-SL); LbrM.20.0770 (*L. braziliensis* M2904); LmjF.34.0820 (*L. major* Friedlin); TcCLB.507671.30 (*T. cruzi* CL Brener haplótipo Esmeraldo-like) e TcCLB.506201.39 (*T. cruzi* CL Brener

haplótipo Non-Esmeraldo-like); EAL24079.1 (*Homo sapiens*); e XP_536040.1 (*Canis familiaris*).

5.2 FASE II – PRODUÇÃO DA PROTEÍNA E DNA RECOMBINANTE

5.2.1 Clonagem do candidato à expressão heteróloga

Inicialmente, foram desenhados um par de primers dos tipos *forward* e *reverse* para o gene utilizado no presente estudo: LINF_340014000, com auxílio do programa *OligoExplorer 1.2* e *OligoAnalyzer 1.2*. O programa NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) foi empregado concomitantemente no desenho dos *primers* para a escolha de duas enzimas de restrição que não apresentavam cortes nas sequências gênicas de interesse e que estivessem presentes no vetor de expressão utilizado. Como o delineamento do trabalho apresenta como objetivo a expressão dessas ORFs tanto em organismos procariotos como em eucariotos, foi adicionado ao *primer* a sequência de Kosak próximo ao ATG (metionina) inicial – **ACCATGG**. Essa sequência é importante para o reconhecimento do RNAm pelos ribossomos de organismos eucariotos para a tradução. O seguinte par de primers foi desenhado: 5'-GGATCCACCATGGGATCTCTAAAGGACGTGAGC-3' (*forward*) e 5'-GAATTCAGGTGCAGTCGATGGATATC-3' (*reverse*) para o gene EF1 β . Foram inseridas as enzimas de restrição (sublinhadas) *Bam*HI e *Eco*RI para os *primers forward* e o *reverse*, respectivamente.

Posteriormente, os *primers* foram utilizados para a amplificação das ORFs na PCR com gradiente de temperatura. O gradiente proporciona alterações na temperatura de anelamento dos *primers* no DNA genômico de *L. infantum* (DNA molde utilizado na PCR). Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose corado com um intercalante de DNA – brometo de etídeo, que fluoresce quando exposto à luz ultravioleta. Após a amplificação com a temperatura de anelamento padronizada, os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T Vector (Promega; ANEXO I). O pGEM-T é um vetor de clonagem pré-linearizado, que possui em suas extremidades 3' uma timidina não pareada, permitindo a ligação da 3'-adenosina do amplicon adicionada pela enzima DNA polimerase, de modo independente do DNA molde, durante a PCR. O vetor também apresenta em sua sequência um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, uma origem de replicação e um sítio múltiplo de clonagem. A ligação do amplicon ao vetor de clonagem foi efetuada com o uso da enzima T4 DNA ligase (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a ligação, foi feita a transformação do plasmídeo recombinante no hospedeiro competente, *E. coli XLI-Blue* (Phoneutria, Brazil), por eletroporação utilizando o equipamento “*MicroPulser Electroporation Apparatus*” (Bio-Rad). Após a clonagem em bactérias, o amplicon foi subclonado nos vetores de expressão pET28a-TEV e pVAX1.0. Para isso, foi feita a digestão dos amplicons com duas enzimas de restrição, *Bam*HI e *Eco*RI, assim como dos vetores de expressão vazios para posterior ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase. O vetor pET28a-TEV (ANEXO II) foi escolhido por ser um plasmídeo utilizado para a expressão de proteína em procariotos e que possui de forma semelhante ao pGEM, sequências que proporcionam resistência ao antibiótico canamicina, um sítio múltiplo de clonagem, um promotor T7 regulável, uma sequência para adição de uma cauda de histidina N- e C- terminal, e em adição um sinal de término de transcrição e sequências para controle da tradução (Shine-Dalgarno). Por sua vez, o vetor pVAX1 (ANEXO III) foi selecionado para ser utilizado na expressão de proteína em mamíferos. Este vetor possui promotor de citomegalovírus (P_{CMV}), origem de replicação, sinais para o término e poliadenilação do transcrito e sequência para reconhecimento do RNAm por ribossomos (sequência de Kozak). Após a inserção do amplicon digerido em ambos vetores de expressão, pET28a-TEV e pVAX1, os plasmídeos foram transformados nos diferentes hospedeiros competentes, *E. coli* Arctic Express (DE3) e DH5 α (Thermo Fischer SCIENTIFIC, Massachusetts, USA), respectivamente.

5.2.2 Preparação do vetor plasmidial para as imunizações

O vetor pVAX1 sem inserto, usado como controle nas imunizações, e com o inserto (ORF que expressa a proteína EF1 β - LINF_340014000) foram transformados em bactéria *E. coli* DH5 α e, posteriormente, purificados utilizando o kit de extração DNA plasmidial (Quiagen, Hilden, Alemanha). A qualidade da extração plasmidial foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

5.2.3 Expressão heteróloga e purificação da proteína rEF1 β

A linhagem *Artic Express* (DE3) foi laborada para a expressão de proteínas recombinantes em vetores dirigidos pelo promotor T7 e diferencialmente das demais *E. coli*, possui uma baixa temperatura de cultivo, cerca de 12°C, favorecendo um aumento da solubilidade da proteína. Além disso, a bactéria apresenta um plasmídeo adicional que expressa um gene que confere resistência à gentamicina e coexpressa outras duas chaperoninas, Cpn10 e Cpn60, adaptadas para o dobramento de proteína a baixas temperaturas. Para a expressão heteróloga e em larga escala da proteína foi utilizado dois litros de meio de cultura 2xYT, com o indutor IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida; Promega, USA) na concentração de 1.0

mM em uma incubadora shaker à 12°C por 4 horas. Essas condições foram determinadas após ter sido realizado o teste de expressão da proteína rEF1 β , nos tempos 0 e 1, 2 e 3 com intervalos de 1 hora usando diferentes concentrações de IPTG (0.5 mM, 1 mM e 1.5 mM), adicionado após a cultura de bactérias ter atingido a densidade óptica de 0,6 (DO₆₀₀=0.6). Após a expressão, a cultura de bactéria foi centrifugada a 2000 x g, por 30 min a 4°C⁸⁵. O pellet de bactérias, armazenado em freezer -80°C, foi ressuspenso utilizando PBS 1x, sonificado e novamente centrifugado à 6.000 x g por 30 minutos a 4°C. A proteína recombinante, contendo a cauda de histidina, foi coletada do sobrenadante e purificada utilizando a coluna de afinidade HisTrap 5 mL (GE Healthcare Life Science) no sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas, AKTApurify plus (GE Healthcare Life Science)⁸⁵. A eluição da proteína foi realizada com uma solução de PBS 1x e 500 mM de imidazol. Seguido da purificação, foram feitas géis de poliacrilamida com diferentes frações da eluição próximas ao pico de purificação da proteína lida através de um espectrofotômetro acoplado ao FLPC. Foram realizados também, o *western blotting* de algumas dessas frações da purificação para a confirmação do grau de pureza. As frações da proteína foram dosadas utilizando o kit “Pierce BCA Protein Assay” (Thermo Scientific) seguindo as recomendações do fabricante.

5.2.4 SDS-PAGE e Western Blotting

As frações de eluição da proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e coradas com a solução *Coomassie-blue* (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%; ácido acético 10%; metanol 50%), e descoradas com solução metanol 30% e ácido acético 10% em água. Para o *Western Blotting*, apenas as frações com proteínas foram separadas por eletroforese e posteriormente transferidas para a membrana de nitrocelulose (Sigma Aldrich, USA) em tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%, pH 8,3) e submetidas a tensão de 100V durante 1 hora no gelo. A membrana foi incubada overnight na solução de bloqueio (PBS-T: Tween 20 0,05%) com a adição de soro fetal bovino (BSA) na concentração de 5%. Posterior ao bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween por 10 minutos e incubada com o anticorpo primário anti-His de camundongo (Sigma Aldrich, USA) na proporção de diluição 1:10.000 na solução de bloqueio. Após três lavagens, na revelação da membrana, foi utilizado 12,5 mg de 4-cloranaftol, 25 mg de diaminobenzidina (DAB; Sigma Aldrich, USA) e 20 μ l de peróxido de hidrogênio. A membrana foi lavada com água destilada para parar a reação da solução reveladora.

5.5 FASE III – TESTE PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

5.3.1 Aprovação do Comitê de Ética

Os Comitês de Ética em Pesquisa Humana da UFMG (protocolo CAAE–32343114.9.0000.5149) e da Santa Casa de Saúde de Belo Horizonte (protocolo CAAE–60802116.1.0000.5138) aprovaram o estudo. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi fornecido e assinado por todos os pacientes envolvidos no estudo. As aprovações ocorreram por meio de documentos que se apresentam no Apêndice desta tese.

5.3.2 Amostras biológicas

Soroteca humana

Amostras de soros foram coletadas de pacientes com LC (n=25, 17 homens e 8 mulheres com idade entre 29-57 anos), LM (n=25, 18 homens e 7 mulheres com idade entre 30-59 anos) e LV (n=30, 19 homens e 11 mulheres com idade entre 28-64 anos) em região endêmica da doença (Belo Horizonte). O diagnóstico da LC e LM foi confirmado por exames clínicos e parasitológicos, com a realização de esfregaços de fragmentos de lesão corados por Giemsa e PCR convencional para identificar o kDNA de *L. braziliensis*, ao passo que aspirados de medula óssea e baço foram empregados para identificar o kDNA de *L. infantum* por PCR convencional para diagnóstico da LV. Amostras de indivíduos sadios (n=30, 18 homens e 12 mulheres com idade entre 22-52 anos) que não apresentavam sintomatologia e resultados sorológicos negativos foram também coletadas de região endêmica. Para verificar a reatividade cruzada, soros de pacientes com doença de Chagas (n=25, 17 homens e 8 mulheres com idade entre 25-45 anos) foram obtidos no “Ambulatório de Referência em Doença de Chagas” da Faculdade de Medicina. Foram também usados soros de pacientes hansenianos (n=10, 5 homens e 5 mulheres com idade entre 35-63 anos), com aspergilose (n=10, 6 homens e 4 mulheres com idade entre 26-47 anos), paracoccidiodomicose (n=10, 6 homens e 4 mulheres com idade entre 26-51 anos), tuberculose (n=10, 4 homens e 6 mulheres com idade entre 25-45 anos) e malária (n=10, 5 homens e 5 mulheres com idade entre 30-49 anos). Essas amostras foram cedidas pela Dra. Rachel Basques Caligorne do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte.

Acompanhamento sorológico pós-terapêutico

Para avaliar a reatividade sorológica da proteína rEF1 β antes e após o tratamento dos pacientes, amostras de soros foram coletadas de pacientes com LV ou LM (n=10 em ambos os casos), antes e após 6 meses do tratamento. Os pacientes tratados foram submetidos ao mesmo regime terapêutico utilizando antimoniais pentavalentes (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brasil) e não apresentavam coinfeção durante o curso do tratamento.

Soroteca canina

As amostras foram obtidas de uma soroteca preexistente na UFMG e gentilmente cedidas pela profa. Dra. Danielle Ferreira de Magalhães Soares (Escola de Veterinária). Soros de cães com LV foram classificados em assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=25), devido à ausência (assintomáticos) ou presença (sintomáticos) de sinais clínicos, como: alopecia, anemia, conjuntivite, dermatite, linfadenopatia e onicogribose. Soros de cães sadios (n=30) que não apresentavam sinais clínicos e obtiveram sorologia negativa para as leishmanioses foram coletados de área endêmica (Belo Horizonte), bem como amostras de cães vacinados com a Leish-Tec® (n=25) e de cães infectados experimentalmente com *Erlichia canis* (n=15), *Babesia canis* (n=10) e *Trypanosoma cruzi* (n=20), que foram mantidos em canis para evitar contato com os vetores.

5.3.3 Produção do antígeno solúvel de *Leishmania*

As espécies *L. infantum* (MOM/BR/1970/BH46) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram utilizadas. Amostras de parasitos foram cultivadas em meio *Schneider Insect Medium* (Sigma-Aldrich) com 20% de soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich, USA), 20 mM de L-glutamina, 200 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina pH 7.4 e a 24°C. Formas promastigotas estacionárias (10^9) foram coletadas e centrifugadas a 10,000 x g por 15 minutos a 4°C e, consecutivamente, foram lavadas três vezes com 5 mL de PBS 1x estéril e gelado. Após cinco ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho-maria, respectivamente, a suspensão celular foi sonicada em seis ciclos a 38MHz usando processador ultrassônico (modelo GEX600). A solução sonicada foi centrifugada 10,000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

5.3.4 ELISA para o diagnóstico das leishmanioses

Curvas de titulação foram realizadas para determinar a quantidade de antígeno mais apropriada e a diluição do anticorpo secundário para a realização do ELISA. Em seguida, microplacas para ELISA de 96 poços (Jetbiofil®, Belo Horizonte) foram sensibilizadas com os antígenos: rEF1 β , SLA *L. braziliensis* e *L. infantum* (0,25, 1,0 e 1,0 μ g por poço, respectivamente), os quais foram diluídos em 100 μ L de tampão de carbonato (pH 9,6) durante 16 h a 4°C. Os poços foram lavados com a solução de lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS 1x) e bloqueados com uma solução de albumina fetal bovina (BSA) 5%, durante 1 h na estufa a 37°C. As placas foram novamente lavadas para a aplicação dos soros na diluição 1:100 em BSA (0,5%) diluído em PBS 1x. Foram utilizados soros de cães saudáveis (n=30), com LV (n=25), cães vacinados (n=25), bem como para cães infectados com *Erlichia canis* (n=15), *Babesia canis* (n=10) e *Trypanosoma cruzi* (n=20). Para os testes em humanos, foram empregados soros de pacientes com LV (n=30), LT (LM mais LC, n=50), indivíduos saudáveis (n=30), pacientes com doença de Chagas (n=25), aspergilose (n=10); hanseníase (n=10), tuberculose (n=10), malária (n=10) e paracoccidiodomicose (n=10). Novamente as placas foram lavadas, e incubadas por 1 h a 37°C com anticorpos secundários anti-IgG humano e anti-IgG canino (Sigma Aldrich, USA), conjugado à peroxidase nas diluições 1:20,000 e 1:10,000, respectivamente. Antes da adição da solução reveladora, 2 μ L H₂O₂, 2 mg ortofenilenodiamina (OPD) em tampão citrato pH 5,0, as placas foram mais uma vez lavadas. A solução reveladora foi incubada ao abrigo da luz por 30 minutos e, posteriormente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 μ L de ácido sulfúrico. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) no comprimento de onda de 492 nm.

5.3.5 Análise sorológica após o tratamento

Para avaliar o efeito prognóstico da proteína rEF1 β antes e após o tratamento, foram coletadas amostras de soros de pacientes com LV ou LM (n=10 em ambos os casos), antes e após 6 meses do tratamento. A produção de anticorpo IgG específico para a proteína recombinante e para o parasito foi investigada conforme descrito (Lima et al., 2018). Resumidamente, as microplacas para ELISA (JetBiofil®) foram sensibilizadas com os antígenos, rEF1 β , SLA *L. braziliensis* e *L. infantum* (0,25, 1,0 e 1,0 μ g por poço, respectivamente), diluídas em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas por 16 horas a 4°C. O protocolo técnico foi semelhante ao descrito no item acima.

5.3.6 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio de planilhas do Software Microsoft Excel (versão 10.0) e do Software GraphPad Prism (versão 6.0). Para os ensaios de diagnóstico, o cut-off foi baseado na curva ROC e avaliados os seguintes parâmetros: sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (AUC) e o índice de Youden (J). Consideraram-se os dados estatisticamente significativos os que apresentaram valor de $P < 0,05$.

5.4 FASE IV – ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO

5.4.1 Aprovação do Comitê de Ética Animal

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG aprovou o estudo com número de protocolo 333/2015. As aprovações ocorreram por meio de documentos que se apresentam no Apêndice desta tese.

5.4.2 Camundongos BALB/c

Camundongos BALB/c fêmeas com 8 semanas de idade foram obtidas do biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG) e foram mantidos em condições livres de patógeno.

5.4.4 Amostras biológicas e ensaio *in vitro* de PBMCs

Amostras de sangue de pacientes com LV (n=6, 3 homens e 3 mulheres com idade entre 35-63 anos), coletadas antes e seis meses após o tratamento, bem como de indivíduos saudáveis (n=6, 2 homens e 4 mulheres com idade entre 27-45 anos) foram coletadas para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (*Human Peripheral Blood Mononuclear Cell - PBMC*), que foram isoladas por centrifugação através de um gradiente de densidade ao utilizar o reagente *Ficoll® Paque Plus (GE Life Sciences)*. As células (1×10^7 ml) cultivadas com meio de cultura *RPMI-1640 Medium (Sigma Aldrich, USA)* foram estimuladas com 10 µg / ml rEF1b, 50 µg / ml SLA *L. infantum* e Concanavalina (controle da viabilidade celular) por cinco dias. Culturas sem estímulo foram utilizadas como controles negativos. Após os cinco dias, foram coletados os sobrenadantes para a dosagem das citocinas. As citocinas, IFN-γ e IL-10, foram

detectadas nos sobrenadantes da cultura através da técnica ELISA sanduíche, utilizando-se o kit *BD OptEIA™Human IFN- e IL-10*, de acordo com as instruções do fabricante.

5.4.6 Experimentação animal

Os ensaios de imunização foram realizados conforme os protocolos padronizados pela equipe do Laboratório de Infectologia e Medicina Tropical, descritos previamente por Zanin et. al, 2007 ¹⁴¹.

5.4.6.1 Ensaios de imunização

Os animais foram divididos em cinco grupos com 16 camundongos cada, como especificado abaixo:

1. Grupo salina (controle da infecção)
2. Grupo saponina 25 µg (controle de adjuvante)
3. Grupo pVAX1 50 µg (controle de plasmídeo)
4. Grupo pVAX1+EF1β 50 µg (plasmídeo recombinante vacinal)
5. Grupos rEF1β 10 µg + Saponina 25 µg (proteína recombinante mais adjuvante)

Foram realizadas três imunizações com intervalos de 15 dias entre as doses.

5.4.6.2 Eutanásia após a imunização e infecção com *Leishmania infantum*

Após 30 dias da última imunização, metade dos animais de cada grupo (n=8) foram anestesiados com cloridrato de xilazina/cetamina e eutanasiados. Foi realizada a coleta do sangue e do baço de cada animal para a avaliação da resposta humoral e celular, respectivamente. Parasitos *L. infantum* na fase promastigota estacionária foram utilizados na infecção, da outra metade dos animais de cada grupo (n=8) na quantidade de 1×10^7 por animal ¹⁴¹.

5.4.6.3 Eutanásia após a infecção com *Leishmania infantum*

Os animais desafiados com *L. infantum* foram eutanasiados após 45 dias da infecção para a retirada de sangue e dos seguintes órgãos: baço, fígado, medula e linfonodo poplíteo. Uma parte do baço foi macerado para o cultivo de esplenócitos e o restante utilizado na análise da carga parasitária por diluição limitante em placas de cultivo de células de 96 poços em meio Schneider em conjunto com os outros órgãos.

5.4.6.4 Resposta celular

O cultivo de esplenócitos foi realizado 30 dias após a última imunização, antes do desafio, bem como 45 dias após a infecção ¹⁴². Os esplenócitos (5×10^6 células por mL) foram cultivados com meio de cultura RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) suplementado com 20 % de soro fetal bovino, 20 mM L-glutamina, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina pH 7.4. Os esplenócitos foram estimulados com os antígenos rEF1b 10 µg/mL e SLA 25 µg/mL por 48 horas a 37°C em estufa de CO₂. Células sem estímulo foram utilizadas como controle negativo. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para a análise da expressão das seguintes citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF com as respectivas diluições: 1:250, 1:250, 1:250, 1:250, 1:500, através do ELISA de captura (BD OptEIA TM set mouse, USA) realizado de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, a célula da origem da síntese e liberação de IFN- γ pelos grupos vacinados foi analisada pela adição de anticorpos monoclonais de camundongos anti-CD4(GK 1.5, BD Biosciences) e anti-CD8(53-6.7, BD Biosciences) no cultivo de esplenócitos *in vitro*. A produção de nitrito foi analisada 45 dias após a infecção, utilizando o mesmo sobrenadante de esplenócitos pelo método de Griess.

5.4.6.5 Immunoblotting

Um ensaio de *immunoblotting* foi realizado de acordo com o protocolo descrito anteriormente, utilizando como antígeno a proteína rEF1b (10 µg por canaleta) como anticorpo primário o pool dos soros dos grupos de camundongos imunizados (n=8), rEF1b e pVAX1+EF1b e como anticorpo secundário o anticorpo antimouse IgG conjugado a enzima peroxidase (Sigma Aldrich, USA). Amostras de soros de animais do grupo salina e de animais *naive* foram utilizados como controle do experimento.

5.4.6.6 Análise da carga parasitária por diluição limitante

A carga parasitária foi realizada 45 dias após a infecção desafio pela técnica de diluição limitante. Os órgãos foram macerados em eppendorfs de 2 mL em meio Schneider incompleto, na proporção 1 ml de meio para 100µg de tecido. Na fileira A da placa de 96wells foi aplicado 180 µl de meio Schneider completo em todos os poços + 20 µl de tecido macerado, enquanto que todos os outros poços foram preenchidos com 180 µl de meio Schneider completo para a realização da diluição seriada a partir da primeira fileira no sentido vertical. Cada amostra foi realizada em triplicata e as diluições de A - H foram, respectivamente: 10^{-1} a 10^{-10} . Ao final, as placas foram cobertas e mantidas na estufa a 24°C por 7 dias até a realização da leitura ¹⁴².

5.4.7 Análise estatística dos dados

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio de planilhas do Software Microsoft Excel (versão 10.0) e do Software GraphPad Prism (versão 6.0). O teste estatístico utilizado para os ensaios de imunizações foi a análise de variância (ANOVA) seguido do pós teste de Bonferroni para comparação entre grupos. Consideraram-se os dados estatisticamente significativos os que apresentaram valor de P menor que 0,05. Os resultados se apresentaram similares com a replicata biológica e técnica.

6 RESULTADOS

6.1 FASE I – BIOINFORMÁTICA

6.1.1 Predição de epítomos para diagnóstico e vacina

6.1.1.1 Linfócitos B

A predição de epítomos específicos para linfócitos B teve como objetivo identificar possíveis alvos de reconhecimento por anticorpos que pudessem ser futuramente utilizados em testes de diagnóstico sorológico. Baseando-se nisso é necessário que haja o reconhecimento da proteína por anticorpos de pacientes com leishmanioses, em detrimento do não reconhecimento pelas de pacientes sadios ou com doenças que podem gerar reações cruzadas nos testes, como a doença de Chagas. A versão utilizada do programa foi a mais recente, *BepiPred 2.0*, que apresenta a predição de epítomos em conjunto com a predição do grau de desordem estrutural da proteína, diferentemente da versão 1.0. Dessa forma, o programa oferece de forma completa a predição de determinantes antigênicos lineares na cadeia de aminoácidos, sem a necessidade do uso de um programa adicional para a predição do grau de desordem.

Foram selecionados como epítomos aqueles peptídeos que apresentaram tamanho maior ou igual a 9 aminoácidos. A Figura 6 mostra um epítopo predito para a proteína EF1 β com um tamanho de 15 resíduos de aminoácidos, apresentando especificidade de 95% e sensibilidade de 10% com *cut-off* de 0,6.

EF1b	
XP_001468460.1	1 MSLKDVSKKAAELESKLGKLFGLGAKPTAEDVKVFNDLLGANHVNLYRWAKNMATYTEG
XP_001468460.1	61 ERKAWGGPVRVAAPPELRMPAPAAAKA VRSDAAAERRAAPKA AAVAPPSAAAAEEDDDID
XP_001468460.1	121 LFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKKDVIKSSILFDIKAWDDTIDLEALAQKLHAIQ
XP_001468460.1	181 RDGLIWGDHKLVPVAFGVKQLQQLIVIEDDKVSGDDLEEMIMGFEVEVQSMDIVAWNKI

Figura 6. Predição de epítomos lineares de célula B para a proteína rEF1 β LINF_340014000. O epítopo predito está realçado em vermelho. Os epítomos lineares foram preditos a partir da sequência de aminoácidos da proteína EF1 β (LINF_340014000), utilizando o programa *BepiPred 2.0* com um *cut-off* de 0,6. O *cut-off* apresentado confere uma especificidade de 95% e uma sensibilidade de 10% nos resultados.

6.1.1.2 Linfócitos T CD4⁺

A predição de regiões determinantes nas proteínas para os linfócitos T helper foi realizada de modo a inferir se a proteína em estudo é um possível candidato vacinal, uma vez que a resposta protetora para as leishmanioses é celular, com predomínio de linfócitos TCD4⁺. Para a predição, foi utilizado o programa *NetMHCpan 3.2 Server*. Os receptores de linfócitos T (TCR) reconhecem peptídeos ligados ao MHC classe II e este apresenta a sua região hipervariável formado por duas cadeias proteicas distintas. Isso proporciona uma maior fenda de ligação peptídeo-MHC, podendo apresentar peptídeos de até 30 aminoácidos. Desse modo, foram selecionados epítomos com tamanho médio de 15 aminoácidos para a predição. Para se estabelecer o limiar entre ligantes fortes e fracos em peptídeos com tamanho de 15 aminoácidos para os alelos humanos, foi determinado um *threshold* de 2% para os fortes e 10% para os fracos. A mesma configuração foi utilizada para ambas as proteínas.

A Figura 7 mostra possíveis regiões de epítomos de linfócitos TCD4⁺ para a proteína EF1β. Foi possível obter cinco epítomos com forte probabilidade ligação ao MHC-II e reconhecimento pelos TCR de células T.

EF1b	
XP_001468460.1	1 MSLKDVSKKAAELESKLGKLFLLGGAKPTAEDVKVFNDLLGANHVNLYRWAKNMATYTEG
XP_001468460.1	61 ERKAWGGPVRVAAP ELRMPAPAAAKAVRS DAAAEKRA APKAAAVAPPSAAAA EEDDDDDID
XP_001468460.1	121 LFGETTEEEKAALAEAKKAKDAEKKKAKKDVI AKSSILFDIKAWDDTI DLEALAQKLHAIQ
XP_001468460.1	181 RDGLIWDHKLVPVAFGVKKLQ QLIVIEDDKVSGDDI EEMIMGFEEEVQSMDIVAVNKI

Figura 7. Predição de epítomos de células T CD4⁺ presentes na proteína EF1β. Os epítomos preditos estão realçados em azul. Os epítomos foram preditos a partir da sequência de aminoácidos da proteína EF1β (LINF_340014000) utilizando o programa *NetMHCpan 3.2 Server* para os alelos HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP de humanos. Foi adicionado um *threshold* de 2% para ligantes fortes e 10% para os fracos com o tamanho dos peptídeos estabelecido para 15 aminoácidos.

6.1.1.3 Linfócitos T CD8⁺

A resposta celular é importante para a proteção contra as leishmanioses e linfócitos T citotóxicos apresentam importante função na proteção ao secretarem citocinas com perfil Th1, importantes conjuntamente na resposta celular protetora^{119,136,143}. Desse modo, a predição foi realizada para identificar se as proteínas em estudo poderiam ser bons candidatos vacinais para as leishmanioses. A predição foi realizada utilizando o programa *NetCTL 1.2 Server* para os supertipos A2, A3 e B7 de humanos. Foi adicionado um *threshold* de 1.0 que confere uma

sensibilidade de 70% e uma especificidade de 99% nos epítomos preditos. Para a proteína EF1 β , foram identificados sete epítomos para linfócitos T citotóxicos, que podem ser observados na Figura 8.

EF1b	
XP_001468460.1	1 MSLKDVSKFAAELESKLGKFLGGAKPTAEDVKVFNDDLGNHVNLYRWAKNMATYTEG
XP_001468460.1	61 ERKAWGGPVRVAAPELRMPAPAAAKAVRSDAAAEKRAAPKAAAVAPPSAAAAEEDDDID
XP_001468460.1	121 LFGETTEEEKAALAKKAKDAEKKKAKKDVIAKSSILFDIKAWDDTIDLEALAQLHAIQ
XP_001468460.1	181 RDGLIWGDHKLVPVAFGVKKLQQLIVIEDDKVSGDDLEEMIMGFEIEVQSMDIVAWNKI

Figura 8. Predição de epítomos de células T CD8+ presentes na proteína EF1 β . Os epítomos preditos estão realçados em verde. Os epítomos foram preditos a partir da sequência de aminoácidos da proteína EF1 β utilizando o programa *NetCTL 1.2 Server* para os supertipos A2, A3 e B7 de humanos. Um *threshold* de 1.0 foi estabelecido de modo a conferir uma sensibilidade de 70% e uma especificidade de 99% nos epítomos.

6.1.2 Alinhamento de proteínas homólogas de outras espécies de parasitos e hospedeiros

Uma vez que as proteínas foram selecionadas como bons alvos para o imunodiagnóstico, um BLAST foi realizado para identificar a existência de proteínas homólogas, ou seja, proteínas que poderiam apresentar os mesmos epítomos em distintas espécies de *Leishmania*, outros tripanosomatídeos, e seus hospedeiros vertebrados. O objetivo do BLAST foi verificar inicialmente se em testes diagnósticos seria possível distinguir pacientes portadores das leishmanioses de outras infecções por membros da mesma família, como *T. cruzi*. E também para verificar se os epítomos preditos poderiam ativar anticorpos, uma vez que poderiam não estimular respostas por serem encontrados também nos hospedeiros vertebrados humano e canino.

Como o gene que codifica a proteína EF1 β apresenta dois ortólogos em *L. infantum*, LINF_340014000 e LINF_340014200, com 100% de identidade, também vistos em *L. donovani* e *L. major*, apenas uma das proteínas homólogas foi selecionada para cada espécie. Genes ortólogos e com sintonia gênica não foram encontrados para a proteína EF1 β na espécie de *L. amazonensis*, devido a menor qualidade de anotação desse genoma banco de dados. Os dois haplótipos do clone CL Brener, Esmeraldo-like e Non-Esmeraldo-like, foram utilizados por análise, devido ao carácter híbrido do genoma desse clone. A tabela 2 mostra as espécies e os identificadores das proteínas homólogas com a proteína em estudo de *L. infantum*.

Tabela 2. Relação das proteínas homólogas a EF1 β e seus identificadores utilizados para o alinhamento global (*ClustalW*). Utilizando como base a proteína EF1 β de *L. infantum* foi possível identificar homólogos entre os tripanosomatídeos e os hospedeiros vertebrados.

Espécie	Identificador (ID)	Número de aa	Identidade com EF1β
<i>Leishmania infantum</i>	LINF_340014000	239 aa	100%
<i>Leishmania donovani</i>	LdCL_340014200	239 aa	100%
<i>Leishmania major</i>	LmjF.34.0820	237 aa	96%
<i>Leishmania braziliensis</i>	LbrM.20.0770	309 aa	81%
<i>Trypanosoma cruzi_Esmo</i>	TcCLB.507671.30	222 aa	73%
<i>Trypanosoma cruzi_Non-Esmo</i>	TcCLB.506201.39	222 aa	73%
<i>Canis familiaris</i>	XP_536040.1	225 aa	40%
<i>Homo sapiens</i>	EAL24079.1	225 aa	39%

Para o alinhamento global, utilizando o programa *ClustalW*, foram selecionadas proteínas homólogas de espécies de tripanosomatídeos, causadoras das leishmanioses e doença de Chagas, e proteínas homólogas nos hospedeiros vertebrados, *Canis familiaris* e *Homo sapiens* (Figura 9).

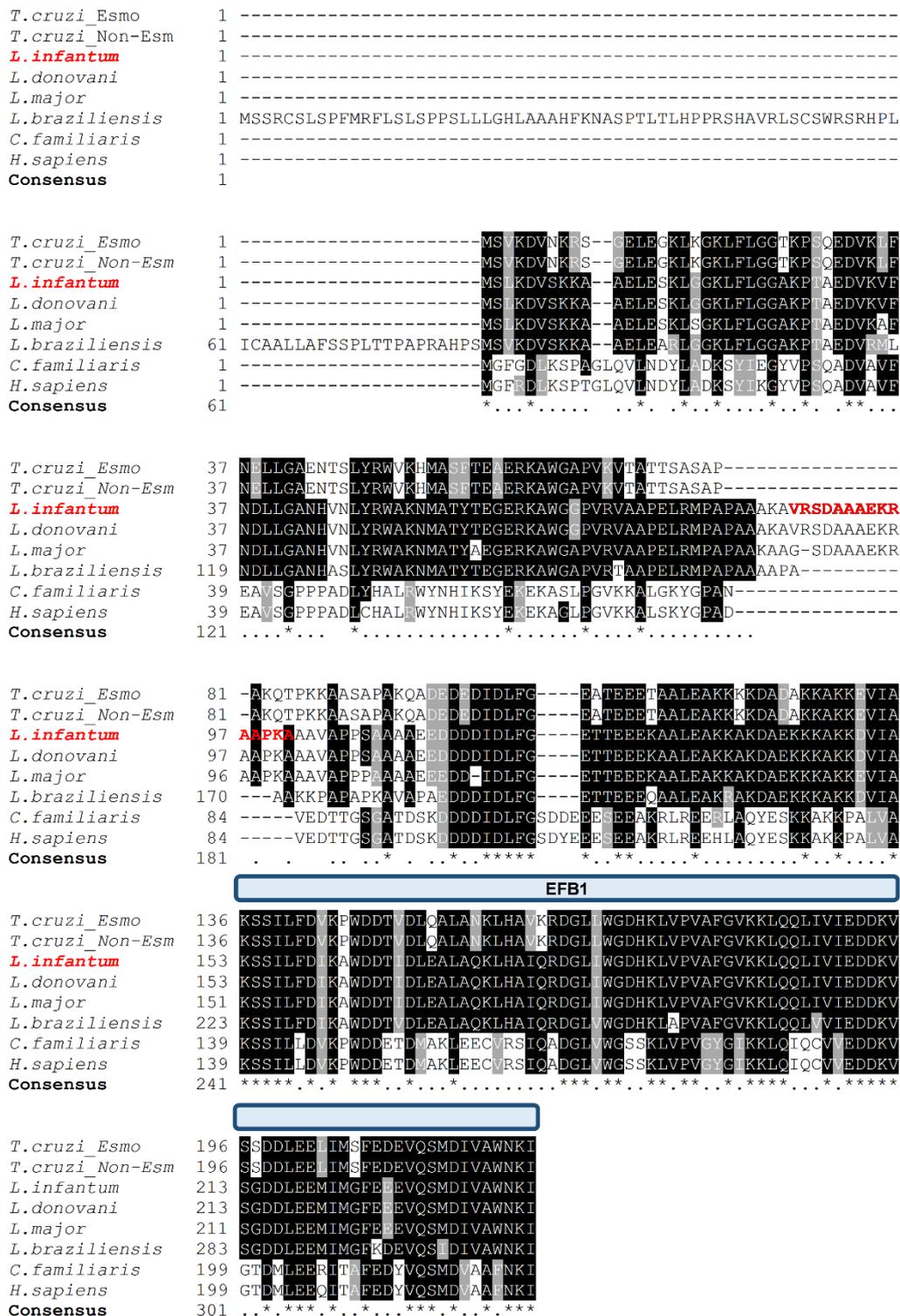


Figura 9. Alinhamento realizado pelo programa *ClustalW*. As proteínas homólogas de *L. donovani*, *L. major*, *L. braziliensis*, e os haplótipos de *T. cruzi*, Esmeraldo-like e Non-Esmeraldo-like, e seus hospedeiros vertebrados, *Canis familiaris* e *Homo sapiens*, foram utilizadas no alinhamento. As regiões sombreadas de preto apresentam 100% de identidade entre os aminoácidos, em cinza são aminoácidos com cadeia lateral pertencentes ao mesmo grupo (apresentam similaridades); regiões sem sombreado são distintas; tracejado –

ausência de correspondência. EF1 – região de domínio funcional (155-239 aa) encontrado no banco de dados do Pfam. Em vermelho, está indicado a sequência de aminoácidos de *L. infantum* correspondente ao epítopo predito de linfócitos B.

Como pode ser observado na Figura 9, as regiões que apresentam maiores diferenças entre as proteínas dos distintos organismos estão localizadas distante da região do domínio, ou seja, são regiões que possivelmente sofrem uma maior pressão evolutiva. É possível notar que para a proteína EF1 β , a sua região de domínio foi conservada em todos os distintos organismos presentes no alinhamento, sugerindo uma preservação da funcionalidade. Foi encontrado um domínio funcional, de acordo com o programa Pfam - EF1 – que apresenta como funcionalidade a troca de nucleotídeos guanina, encontrado nas cadeias beta e delta dos fatores de alongamento de eucariotos e archaea^{131,132}.

Na mesma figura é possível visualizar, em vermelho, distante da região conservada de domínio, o epítopo (posição 87-101) de linfócitos B predito para a proteína. O epítopo apresenta-se bastante conservado em *L. donovani* (agente etiológico causador da LV em países do Velho Mundo) e com apenas dois aminoácidos distintos em *L. major* (agente da LT em países do Velho Mundo), porém, ausentes em outros Tripanosomatídeos e hospedeiros mamíferos (Figura 9). Dessa forma, podemos sugerir que essas proteínas sejam potenciais candidatos para o diagnóstico sorológico das leishmanioses, uma vez que não apresentam homologia com seus hospedeiros e outros tripanosomatídeos de outros gêneros, que poderiam gerar resultados falso-positivos devido à reação cruzada; com a ressalva de que podem ainda discriminar as diferentes formas da doença, por não apresentarem 100% de homologia com as espécies causadoras da LV e LT.

Na figura 10, o alinhamento é novamente representado, porém com os epítopos que foram preditos para os linfócitos T responsáveis pela resposta celular. Em amarelo, temos os epítopos de linfócitos T citotóxicos, em azul, os de linfócitos T auxiliares, enquanto que em verde estão a sobreposição de ambos. É possível notar que há vários epítopos em potencial na proteína EF1 β e que muitos estão fora da região de domínio da proteína, que são regiões variáveis no homem e no cão. Vale ressaltar a importância dessa informação, uma vez que a utilização de alvos vacinais com alta homologia podem gerar respostas autoimunes. E em adição, os epítopos presentes fora da região de domínio, além de apresentarem variações na sequência aminoacídica com os hospedeiros, também apresentam altas similaridades com as diferentes espécies de tripanosomatídeos, mostrando que podem apresentar uma resposta celular de amplo espectro para as leishmanioses, e até mesmo para a doença de Chagas.

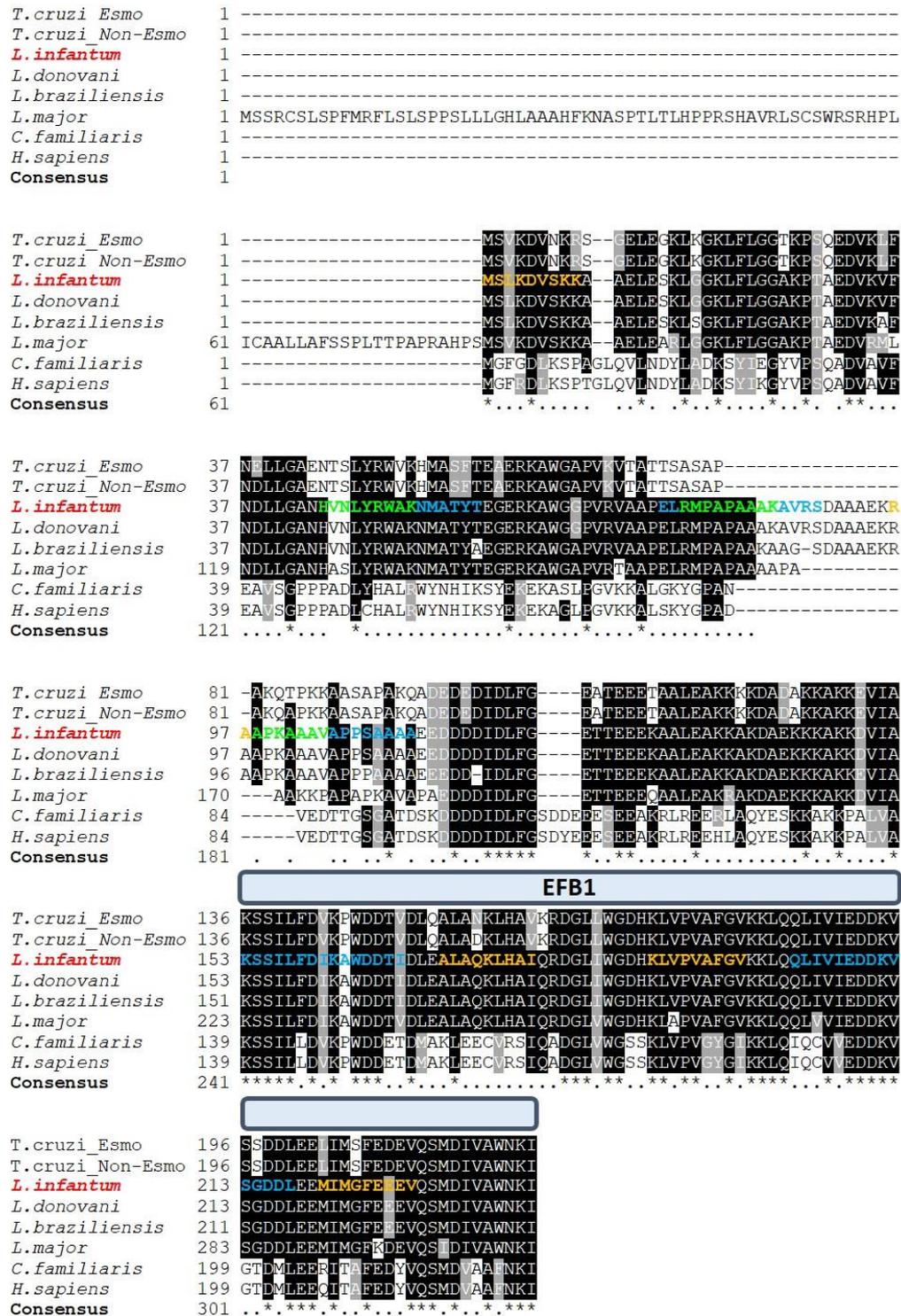


Figura 10. Alinhamento global, realizado pelo programa *ClustalW*, de seqüências proteicas e epítomos de linfócitos T homólogos à proteína EFB1 de *L. infantum* com outros tripanossomatídeos e hospedeiros. As proteínas homólogas de *L. donovani*, *L. major*, *L. braziliensis*, haplótipos de *T. cruzi*, Esmeraldo-like e Non-Esmeraldo-like, e seus hospedeiros vertebrados, *Canis familiaris* e *Homo sapiens*, foram utilizadas no alinhamento. As regiões

sombreadas de preto apresentam 100% de identidade entre os aminoácidos, em cinza são aminoácidos com cadeia lateral pertencentes ao mesmo grupo (apresentam similaridades); regiões sem sombreamento são distintas; tracejado – ausência de correspondência. EF1 – região de domínio funcional (155-239 aa) encontrado no banco de dados do Pfam. Em azul, está indicado a sequência de aminoácidos de *L. infantum* correspondente aos epítomos predito de linfócitos T CD4+, em amarelo para os de T CD8+ e em verde, a sobreposição dos epítomos de linfócitos T.

6.2 FASE II – PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E DNA

6.2.1 Clonagem do candidato à expressão heteróloga

O gene que codifica a proteína EF1 β (LINF_340014000) foi clonado no vetor pGEM-T Easy. A figura 11 mostra os produtos de uma PCR de gradiente de temperatura para que seja possível verificar a temperatura de anelamento (*melting*) ideal para cada par de *primer* desenhado. O termociclador foi programado com as seguintes variações de temperatura: 51°C, 54°C, 57°C e 60°C. A temperatura ideal de anelamento do *primer* para a proteína rEF1 β foi de 51°C.

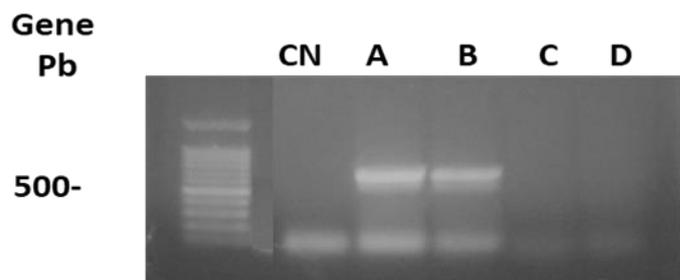


Figura 11. Análise eletroforética em gel de agarose da PCR de gradiente para o gene que codifica a proteína EF1 β (LINF_340014000). As bandas de amplificação do gene que codifica a proteína EF1 β (A-D) foram inseridas após o controle negativo do par de primer (CN) e em ordem crescente das distintas temperaturas de melting utilizadas no termociclador. Foram programadas as diferentes temperaturas de melting: 51°C, 54°C, 57°C e 60°C. Na primeira canaleta é possível visualizar o padrão de peso molecular (pb) utilizado para verificar o peso da proteína, EF1 β (720 pb); pb = pares de base.

Após ser determinada a temperatura de *melting* ideal para a amplificação da ORF, uma segunda PCR foi realizada para a ligação ao vetor pGEM-T Easy pela enzima T4 DNA ligase (Figura 12).

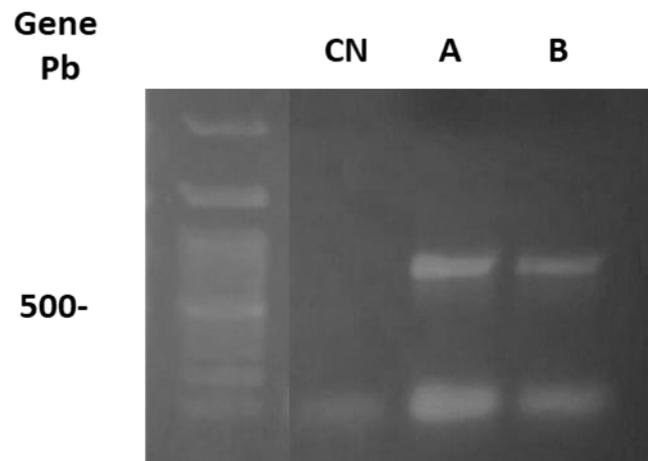


Figura 12. Análise eletroforética em gel de agarose 1% da PCR para amplificação do gene que codifica a proteína EF1 β (LINF_340014000). Através do gel de agarose 1% é possível visualizar as bandas de amplificação por PCR do gene LINF_340014000 (A e B), banda de 720 pb, seguidos do padrão de peso molecular (pb) e do controle negativo (CN); pb = pares de base.

Em paralelo, os vetores de expressão em procariotos e eucariotos, pET28a-TEV e pVAX1, respectivamente, foram digeridos duplamente com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI para que pudessem se ligar aos amplicons após clivagem do vetor pGEM-T Easy (Figura 13). Após clonagem nos vetores de expressão, as colônias foram verificadas por PCR de colônia e sequenciamento (Myleus Biotechnology).

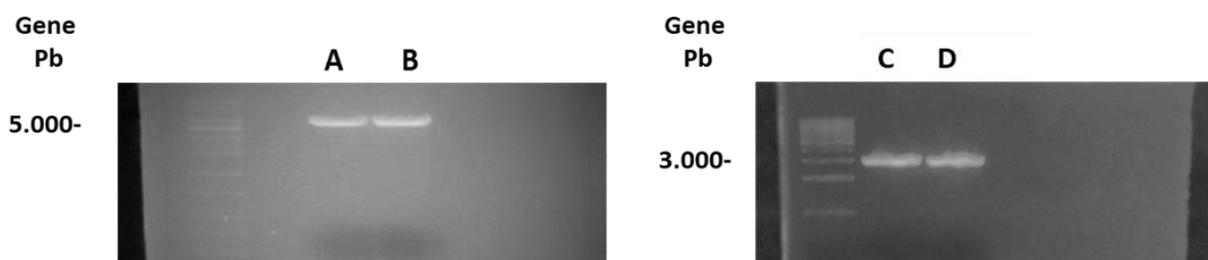


Figura 13: Análise eletroforética em gel de agarose dos vetores plasmidiais, pET28a-TEV (esquerda) e pVAX1(direita), após a dupla digestão com as enzimas de restrição, *Bam*HI e *Eco*RI. Através do gel de agarose 1% é possível visualizar os vetores, pET28a-TEV (A e B, à esquerda) e pVAX1 (C e D, à direita), com os tamanhos de aproximadamente 5Kb e 3Kb,

respectivamente, devido a linearização proporcionada pela digestão. As amostras foram aplicadas seguidas do padrão de peso molecular (A); pb = pares de base.

6.2.2 Expressão heteróloga e purificação da proteína eF1 β (LINF_340014000) por cromatografia de afinidade

A proteína foi purificada utilizando a coluna de afinidade HisTrap, devido a presença da cauda de histidina adicionada pela sequência do vetor pET28a-TEV. De acordo com o cromatograma (Figura 14), é possível visualizar a eluição da proteína rEF1 β a partir da fração 16 até a fração 22. Após a purificação, as frações contendo a proteína rEF1 β eluída foram corridas em eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% para a visualização das bandas correspondentes e posterior confirmação por *western blotting*, usando anticorpo anti-His (Figura 15). É possível visualizar pelo *western blotting* que a proteína apresentou uma corrida anômala e dímeros na sua eluição, devido a banda de 60.0 kDa observada acima da banda esperada.

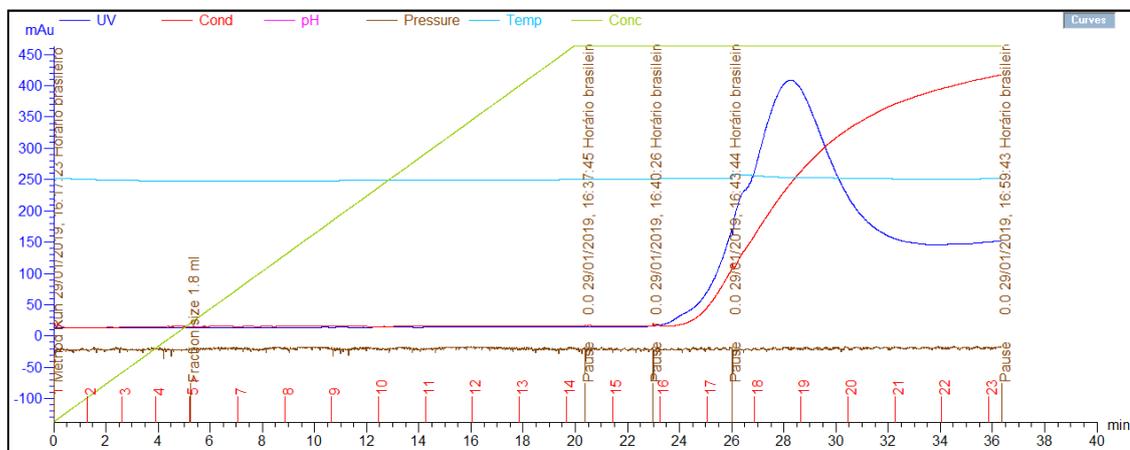


Figura 14. Cromatograma obtido durante purificação da proteína rEF1 β (LINF_340014000) de *L. infantum*. O gráfico mostra, pelo eixo Y, a eluição da proteína recombinante (pico azul) lida através de um espectrofotômetro acoplado ao FLPC, na linha verde o gradiente de imidazol de 30 mM para 500 mM e a condutividade (linha vermelha). O eixo X nos mostra as frações coletadas de 1.8 mL.

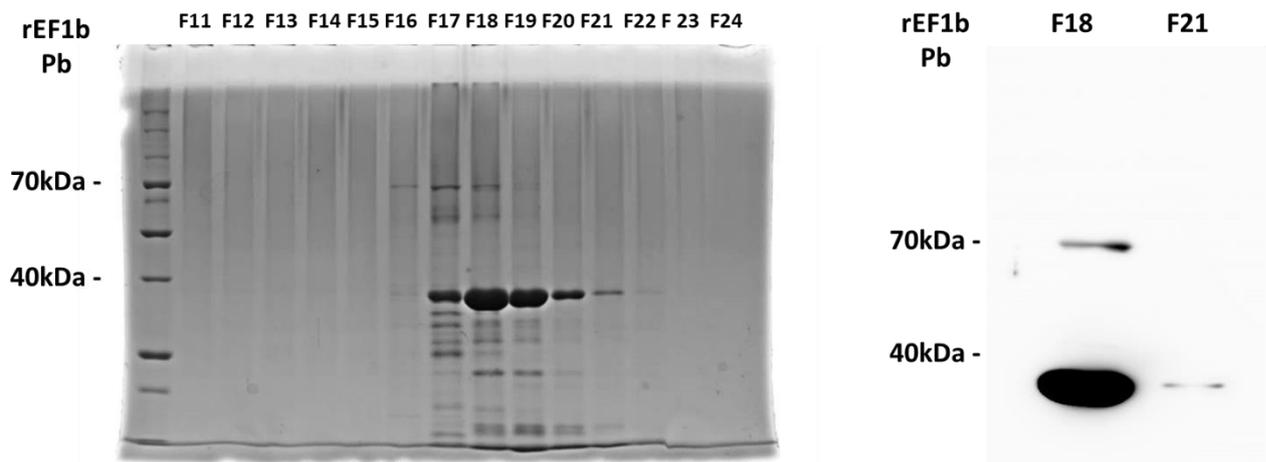


Figura 15. Gel de poliacrilamida 12% (esquerda) e *Western Blotting* (direita) da purificação da proteína rEF1 β de *L. infantum*. Após a purificação pela coluna de cromatografia, frações da eluição foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% (à esquerda). O gel foi corado por Coomassie Blue. Em seguida, um *Western Blotting* foi realizado de modo a verificar a correta purificação da proteína (à direita).

6.3 FASE III – TESTE PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

6.3.1 ELISA para o diagnóstico da leishmaniose humana

Após a purificação, a proteína rEF1 β foi utilizada como antígeno para a detecção de anticorpos IgG em ensaios de ELISA para sorodiagnóstico sorológico das leishmanioses. Os resultados obtidos foram comparados com os ELISAs utilizando os antígenos solúveis de *Leishmania* (*L. infantum* e *L. braziliensis*) como controle dos testes. Os soros de pacientes com LV e LT foram utilizados nos ensaios e, como controle negativo, soros de indivíduos saudáveis de área endêmica. Amostras de pacientes portadores de outras doenças, como doença de Chagas, hanseníase, aspergilose, tuberculose, malária e paracoccidiodomicose, foram empregadas para avaliar a reação cruzada.

A curva ROC foi empregada para determinar os limites de reatividade (*cut-off*), ou seja, os valores que indicam quais absorbâncias são consideradas positivas (acima do valor de *cut-off*) e negativas (abaixo do valor de *cut-off*) dentro de um conjunto de dados. Foram também obtidos os valores de sensibilidade e especificidade dos testes, e da área sob a curva (AUC),

que aponta o desempenho do ensaio. O índice de Youden foi utilizado para avaliar a performance do teste de diagnóstico dicotômico. A figura 16 apresenta os resultados comparativos dos testes de ELISA em amostras de soro de humanos saudáveis e portadores das leishmanioses, bem como para os portadores de doenças com possibilidade de reatividade cruzada, utilizando a proteína rEF1 β e SLA de *L. infantum* ou *L. braziliensis*.

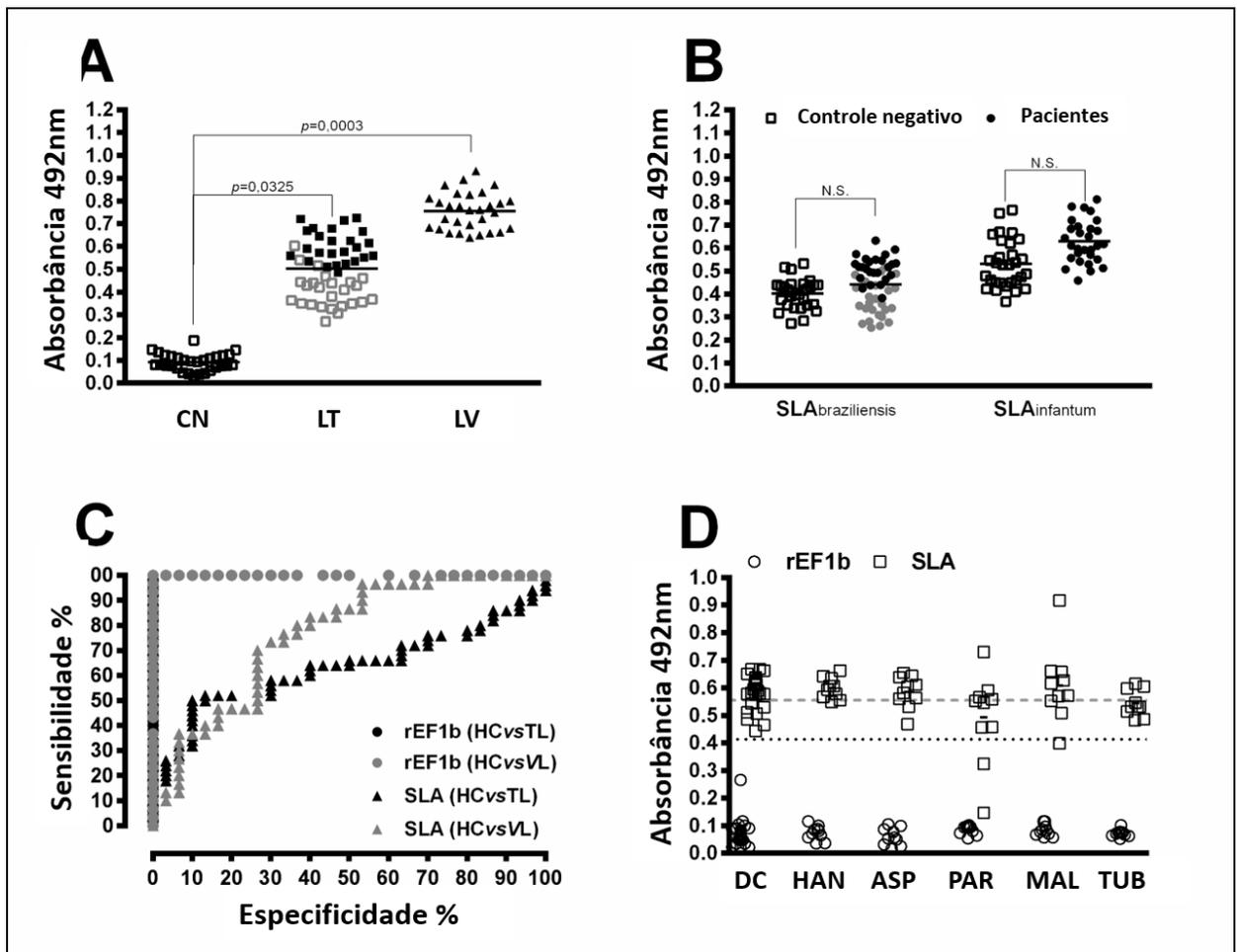


Figura 16. Desempenho do diagnóstico em amostras de soro de humanos saudáveis e portadores das leishmanioses, bem como para os portadores de doenças com possibilidade de reações cruzadas, utilizando a proteína rEF1 β e SLA de *L. infantum* e *L. braziliensis*. Os ensaios de ELISA foram realizados com soros de pacientes com LC (n=25, cinza), LM (n=25, preto) e LV (n=30). As amostras de indivíduos saudáveis de área endêmica (CN, n=30), bem como de pacientes com doença de Chagas (DC, n=25), hanseníase (HS, n=10), aspergilose (ASP, n=10), paracoccidiodomicose (PAR, n=10), malária (MAL, n=10), e tuberculose (TUB, n=10) foram usadas. As absorbâncias (eixo y) das amostras são apresentadas

para cada amostra frente aos antígenos rEF1 β (A) e SLA de *L. infantum* ou *L. braziliensis* (B). A média de cada grupo é indicada, bem como a diferença entre os grupos. A curva ROC foi construída para a obtenção dos valores de sensibilidade (Se), especificidade (Esp) e área sob a curva (AUC) (C). Após a determinação do *cut-off* baseado na curva ROC, este foi utilizado para delimitar reações inespecíficas entre antígenos e soros de pacientes portadores da LV (linha pontilhada cinza) e LT (linha pontilhada escura) (D).

É possível visualizar na figura 16 uma alta reatividade de anticorpos anti-rEF1 β (Figura 16A) presentes em pacientes com LV e LT, ao passo que nenhuma reatividade significativa foi encontrada em indivíduos saudáveis de área endêmica. No entanto, essa distinção de reatividade entre indivíduos positivos e negativos não foi estatisticamente significativa quando o antígeno utilizado foi o SLA, como apresentado na Figura 16B. Isso demonstra que a proteína rEF1 β teve a capacidade de distinguir indivíduos portadores da doença em estudo em detrimento do não reconhecimento de indivíduos saudáveis.

Resultados semelhantes foram vistos quando amostras de reação cruzada foram testadas, em que anticorpos anti-rEF1 β apresentaram baixa reatividade e os anticorpos anti-SLA apresentaram alta reatividade. Estes resultados indicam que o antígeno rEF1 β apresenta alta especificidade, quando comparado ao SLA, que indicou maior reconhecimento de amostras como falso-positivas.

A curva ROC para os dois diferentes antígenos utilizados foram elaboradas (Figura 16C). Para a proteína rEF1 β , a AUC apresentou o valor de 1.0, indicando que os resultados obtiveram um desempenho de 100% de sensibilidade e especificidade (Tabela 3). No entanto, para SLA, os valores de sensibilidade e a especificidade foram de 76.7% e 66.7%, respectivamente, com AUC de 0.78. Em vista disso, é possível inferir que o uso do antígeno recombinante EF1 β não apresentou resultados falso-positivos, diferentemente do SLA, em que resultados falso-positivos foram encontrados, demonstrando a menor especificidade dessa preparação antigênica composta por distintas proteínas do parasito.

Tabela 3. Desempenho diagnóstico em amostras de soros de pacientes com LV e indivíduos saudios, bem como com portadores de reação cruzada, utilizando a proteína rEF1 β e SLA.

Os resultados obtidos foram utilizados para os cálculos de sensibilidade (Se; 95%IC), especificidade (Esp; 95%IC), intervalo de confiança (95%IC), área sob a curva (AUC) e índice de Youden (J).

Antígeno	AUC	p-valor	Cut-off	Se	95%IC	Esp	95%IC	J
rEF1 β	1	< 0,0001	> 0.4135	100	88.43-100	100	88.43-100	1.00
SLA	0.78	0.0004	> 0.5550	76.67	57.72-90.07	66.67	47.19-82.71	0.43

Analizamos a eficiência da proteína em discriminar pacientes tratados dos não tratados. Na figura 17 é possível verificar diferença significativa comparando a proteína contra SLA. A proteína foi capaz de diferenciar pacientes tratados dos não tratados, bem como correlacionar a presença de baixos níveis de anticorpos específicos com a cura clínica dos pacientes de ambas as formas de leishmanioses.

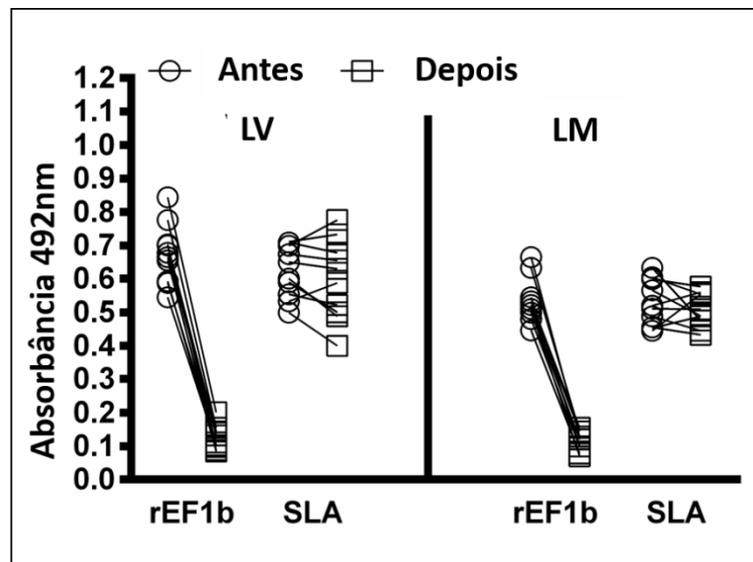


Figura 17. Comparação da eficiência da proteína rEF1 β e SLA de *Leishmania* em discriminar, por testes sorológicos, pacientes tratados dos não tratados. Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando amostras de soro de pacientes com leishmaniose visceral (LV, n = 10) ou leishmaniose mucosa (LM, n = 10); que foram coletados antes (\circ) e seis meses após o tratamento (\square). Os valores de absorbâncias (eixo y) para cada amostra são apresentados para os diferentes antígenos: rEF1 β e SLA de *L. infantum* ou *L. braziliensis*.

6.3.2 Elisa para o diagnóstico da leishmaniose canina

Ensaio foram também realizados para o diagnóstico sorológico das LVC, uma vez que estes animais se comportam como reservatório em áreas urbanas. O painel sorológico canino foi composto por cães positivos (sintomáticos e assintomáticos) e negativos (sadios), bem como por cães vacinados e com doenças que apresentam reação sorológica cruzada, como os infectados com *E. canis*, *B. canis* e *T. cruzi*.

Similaridades foram encontradas com os ensaios realizados em humanos (Figura 18). Os resultados mostraram alta reatividade de anticorpos anti-rEF1 β nas amostras positivas (tanto em cães sintomáticos quanto assintomáticos), mas não para soros negativos ou de reação cruzada (Figura 18A e 18D). As absorvâncias das reações de anticorpos contra o SLA mostraram menor discriminação entre soros positivos e negativos, bem como para amostras de reação cruzada (Figura 18B e 18D).

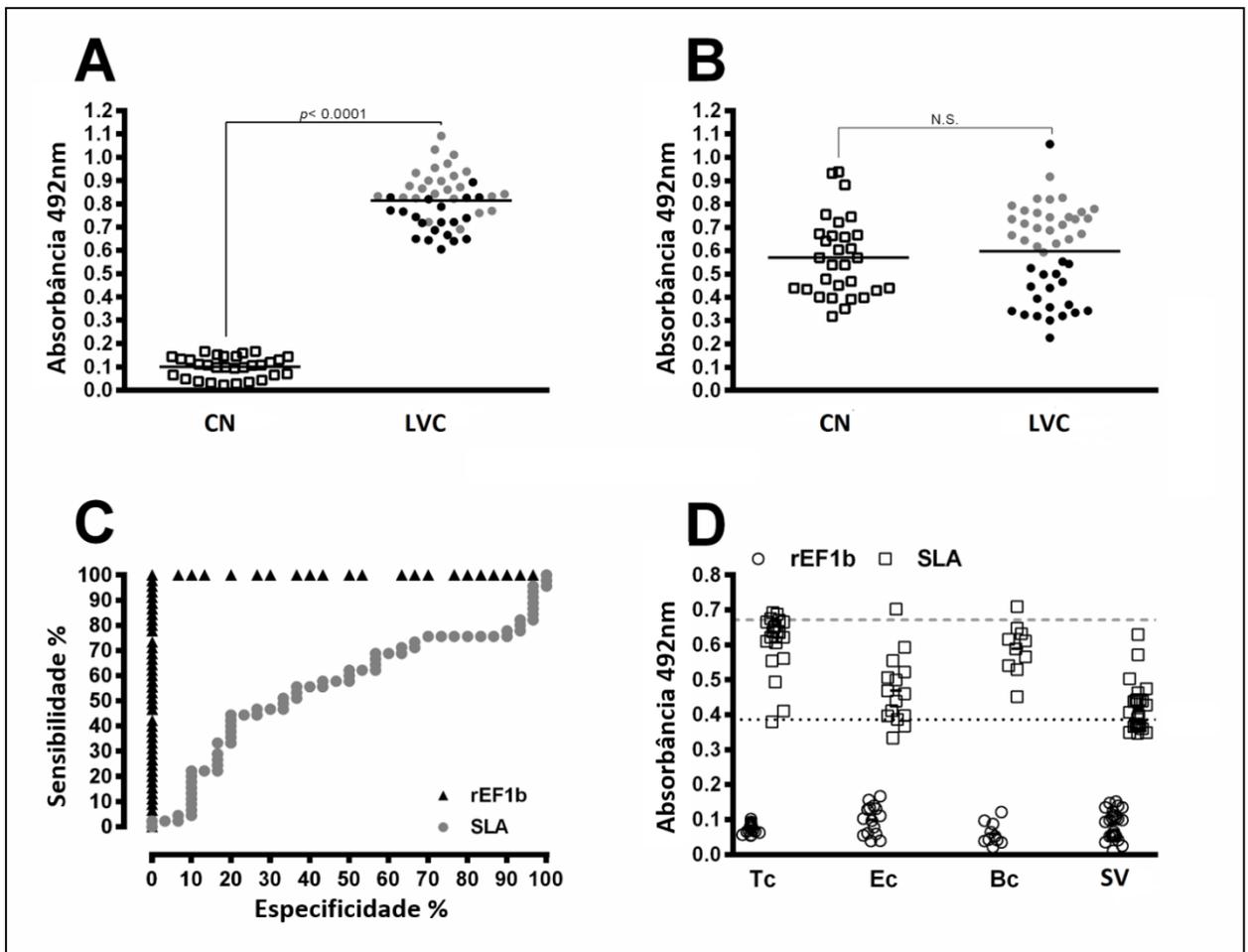


Figura 18. Desempenho diagnóstico em amostras de cães sadios e portadores das leishmanioses, bem como para os portadores de doenças com possibilidade de reações cruzadas, utilizando a proteína rEF1 β e SLA de *L. infantum* ou *L. braziliensis*. Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando soros de cães assintomáticos (n=20) e sintomáticos (n=25) para LV, animais sadios (n=30) de área endêmica, bem como amostras de cães infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi* (Tc, n=20), *Ehrlichia canis* (Ec, n=15), e *Babesia canis* (Bc, n=10); além de cães vacinados com Leish-Tec[®] (SV, n=25). Os valores das absorvâncias (eixo y) são mostrados nas figuras para cada amostra frente aos antígenos rEF1 β (A) e SLA de *L. infantum* (B). A média de cada grupo é indicada, bem como a diferença entre os grupos. Os resultados da especificidade, sensibilidade e área sob a curva (AUC) foram calculados pela curva ROC (C). Após a determinação do *cut-off* baseado na curva ROC, este foi utilizado para determinar reações inespecíficas entre cães sintomáticos (linha pontilhada cinza) e assintomáticos (linha pontilhada escura) (D).

A curva ROC obtida para os antígenos rEF1 β e SLA de *L. infantum* foram comparadas na Figura 18C. Para a proteína recombinante, a curva indicou valor de 1.0 de AUC, mostrando que o teste apresentou desempenho eficiente ao estabelecer especificidade e sensibilidade de 100%. Para o SLA, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 44.4% e 80.0%, respectivamente, com AUC de 0.55 (Tabela 4).

Tabela 4. Desempenho diagnóstico em amostras de soro de cães sadios e portadores da LV, bem como com doenças que causam reações cruzadas, utilizando a proteína rEF1 β e SLA. Os resultados obtidos foram utilizados para os cálculos de: sensibilidade (Se; 95%IC), especificidade (Esp; 95%IC), intervalo de confiança (95%IC), área sob a curva (AUC) e índice de Youden (J).

Antígeno	AUC	p-valor	Cut-off	Se	95%IC	Esp	95%IC	J
rEF1β	1	< 0.0001	> 0.386	100	92.13-100	100	88.40-100	1.00
SLA	0.55	0.426	> 0.672	44.44	29.64-60.00	80.00	61.43-92.29	0.24

O uso do antígeno EF1 β não mostrou resultados falso-positivos, diferentemente do SLA, em que resultados falso-positivos foram encontrados em cães com doença de Chagas,

ehrlichiose e babesiose, confirmando a baixa especificidade do SLA com antígeno para o diagnóstico da LVC.

Portanto, a proteína rEF1 β utilizada neste trabalho demonstrou ser um excelente candidato para o diagnóstico das leishmanioses, tanto para a forma visceral quanto para a tegumentar, em humanos e cães, apresentando-se sensível, específica e sem reação cruzada com outras doenças ou com animais vacinados. Além disso, a proteína apresentou-se como promissora candidata para o acompanhamento sorológico de pacientes após o tratamento e cura da doença.

6.4 FASE IV – ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO

6.4.1 Avaliação da resposta *in vitro* em culturas de PBMCs

Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LV tratados e não tratados e de indivíduos saudáveis foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo e deixadas sem tratamento (meio) ou estimuladas com rEF1b e SLA (10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) por 5 dias a 37°C em 5% (v/v) CO_2 . A linfoproliferação foi avaliada por ensaio de ELISA usando o kit de *ELISA Cell Proliferation Biotrak™* versão 2 (*GE Healthcare*), de acordo com as instruções do fabricante. Na figura 19 é possível verificar que as células dos diferentes grupos obtiveram uma linfoproliferação significativa entre os indivíduos saudáveis e pacientes tratados, em relação aos não tratados.

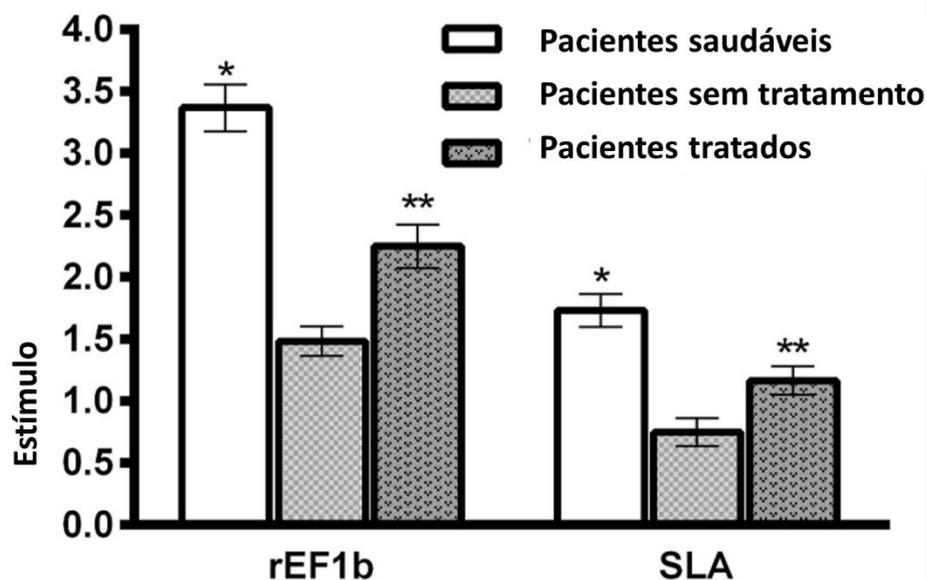


Figura 19. Ensaio de linfoproliferação em culturas de PBMCs de pacientes com leishmaniose visceral e indivíduos saudáveis. A resposta linfoproliferativa específica para rEF1b e SLA de *L. infantum* foi avaliada em culturas de PBMCs de pacientes com LV antes e após o tratamento, bem como de indivíduos saudáveis. Os resultados foram calculados como a razão entre os valores de densidade óptica para as culturas não estimuladas e estimuladas. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos pacientes não tratados e tratados ($P < 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos pacientes não tratados ($P < 0,05$).

Ao analisar a figura 20, é possível notar que o aumento na proliferação celular gerou uma produção significativa de IFN- γ em relação à produção de IL-10, que foram dosadas no sobrenadante das culturas, em indivíduos saudáveis e pacientes tratados, após o estímulo com a proteína rEF1b. O contrário foi encontrado frente ao estímulo com SLA, em que pacientes tratados e não tratados tiveram uma expressão significativamente maior de IL-10 em relação a produção de IFN- γ . Quando feita a razão entre IFN- γ e IL-10, apresentada na figura 20B, é possível observar a resposta tipo Th1 nos grupos de indivíduos saudáveis e pacientes tratados, por apresentarem uma maior produção de IFN- γ .

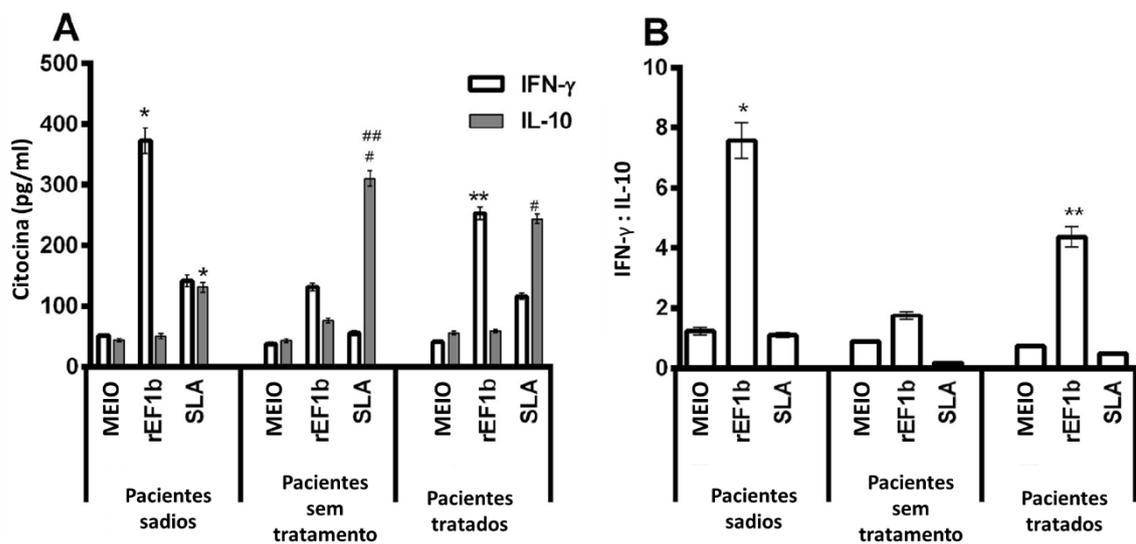


Figura 20. Ensaio de citocinas humanas nos sobrenadantes de culturas de PBMCs. (A) Níveis de IFN- γ e IL-10 medidos no sobrenadante de culturas por ELISA de captura usando kits comerciais. (B) Razões entre os níveis de IFN- γ e IL-10. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos pacientes não tratados e tratados ($P < 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos pacientes não tratados ($P < 0,05$). (#) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos indivíduos saudáveis e pacientes tratados ($P < 0,05$). (##) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos pacientes tratados ($P < 0,05$).

6.4.2 Avaliação da resposta imune em animais antes da infecção desafio

A resposta celular e humoral dos animais frente as diferentes imunizações foi analisada antes da infecção desafio com promastigotas de *L. infantum*. Desse modo, 30 dias após a última imunização, foi realizado o cultivo dos esplenócitos de metade dos animais de

cada grupo (n=8). As células do baço (5×10^6 por mL) foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo e deixadas sem tratamento (meio) ou estimuladas com rEF1b ou SLA (10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) por 48 h a 37°C em 5% (v/v) CO_2 . A figura 21 apresenta os níveis das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF que foram dosadas nos sobrenadantes das culturas por ELISA de captura, de acordo com as instruções do fabricante.

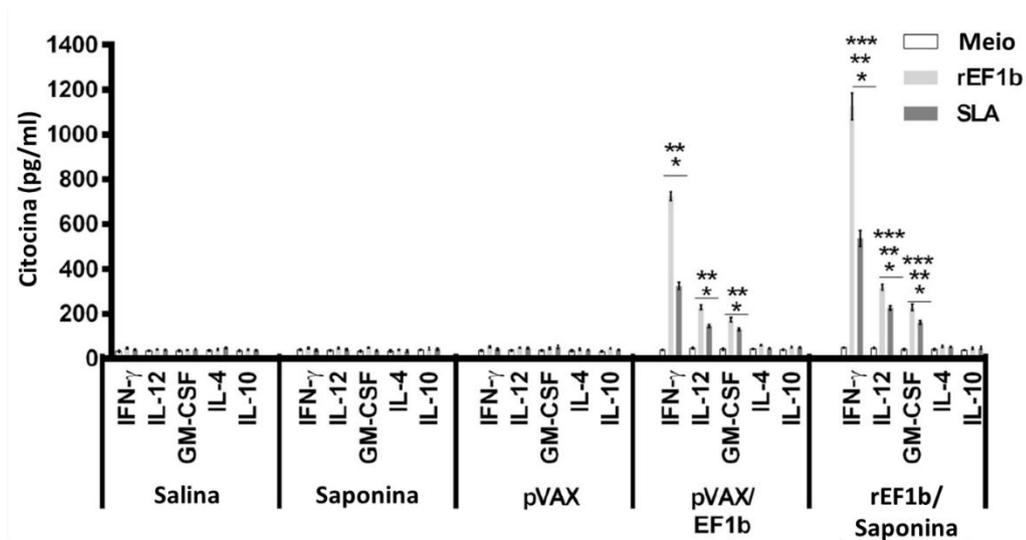


Figura 21. Resposta celular induzida antes da infecção de desafio. (A) Níveis de IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF medidos nos sobrenadantes da cultura por ELISA de captura. (B) Razões entre os níveis de IFN- γ e IL-10. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos solução salina e saponina ($P < 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo pVAX ($P < 0,05$). (***) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo pVAX / EF1b ($P < 0,05$).

Os grupos imunizados pVAX/EF1b e rEF1B/saponina apresentaram expressiva produção de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF em relação aos grupos controles, que receberam salina, saponina ou pVAX. O grupo imunizado com rEF1b mais saponina se destacou por desenvolver uma produção mais alta de citocinas tipo Th1, quando comparada ao grupo imunizado com a vacina pVAX/EF1b.

As amostras de soros dos camundongos imunizados (n=8, cada grupo) foram coletadas para análise da resposta humoral por ensaios de ELISA. A análise dos níveis dos

isotipos IgG1 e IgG2a anti-rEF1b e anti-SLA usando os soros dos animais vacinados mostrou que a imunização com rEF1b/saponina induziu níveis mais elevados de anticorpos anti-rEF1b do isotipo IgG2a, em comparação com os níveis de IgG1 (figura 22).

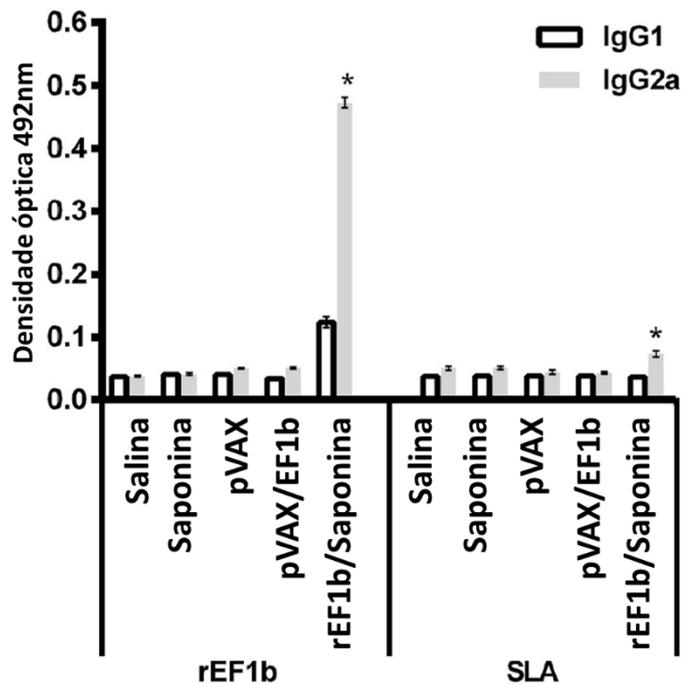


Figura 22. Produção de anticorpos após as imunizações e antes da infecção desafio. Os camundongos foram vacinados (n=8 por grupo) e, 30 dias após a última dose da vacina, amostras de soro foram coletadas para análise dos níveis de IgG1 e IgG2a anti-rEF1b e anti-SLA. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos salina, saponina, pVAX e pVAX/EF1b ($P < 0,05$).

6.4.3 Avaliação da resposta imune após a infecção

A resposta celular e humoral dos animais foi também avaliada 45 dias após a infecção. Como pode ser visto na figura 23, que mostra a produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas, os grupos vacinados com rEF1b/saponina e pVAX/EF1b mantiveram o padrão de alta produção das citocinas IFN- γ , IL-12 e GM-CSF, além da baixa produção de IL-4 e IL-10, em relação aos demais grupos que receberam salina, saponina ou pVAX.

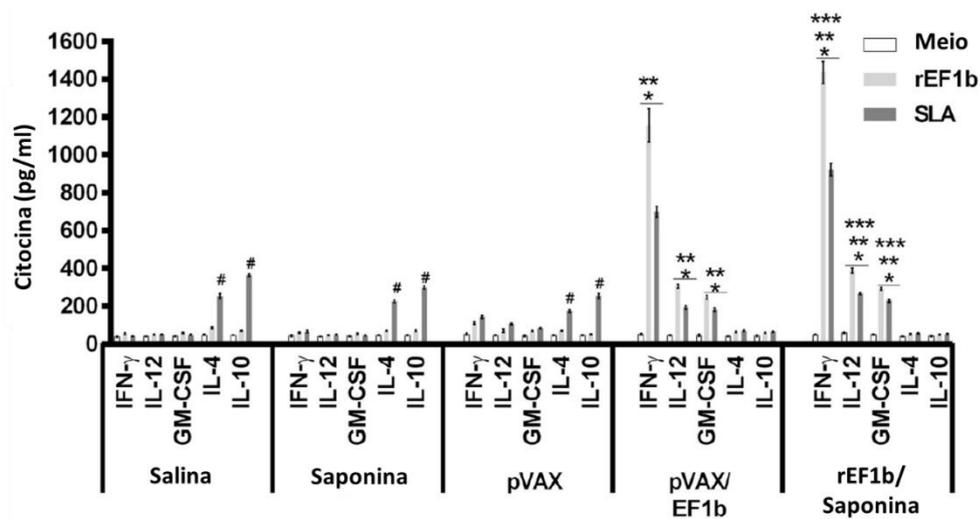


Figura 23. Produção de citocinas induzida após a infecção com *L. infantum*. Os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF medidos nos sobrenadantes das culturas são indicados (A), além das razões entre IFN- γ e IL-10 (B). As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos solução salina e saponina ($P < 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo pVAX ($P < 0,05$). (***) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo pVAX / EF1b ($P < 0,05$). (#) indicam diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos pVAX / EF1b e rEF1b / Saponina ($P < 0,05$).

Foi realizada a análise do envolvimento dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na produção de IFN- γ nos grupos vacinados e infectados. Na figura 24 é possível observar que a produção de IFN- γ foi significativamente diminuída quando houve o bloqueio de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos grupos imunizados com pVAX/EF1b e rEF1b/saponina, sendo a produção desta citocina mais diminuída nas células T CD8⁺ no grupo pVAX/EF1b e por células T CD4⁺ no grupo imunizado com a proteína recombinante mais saponina.

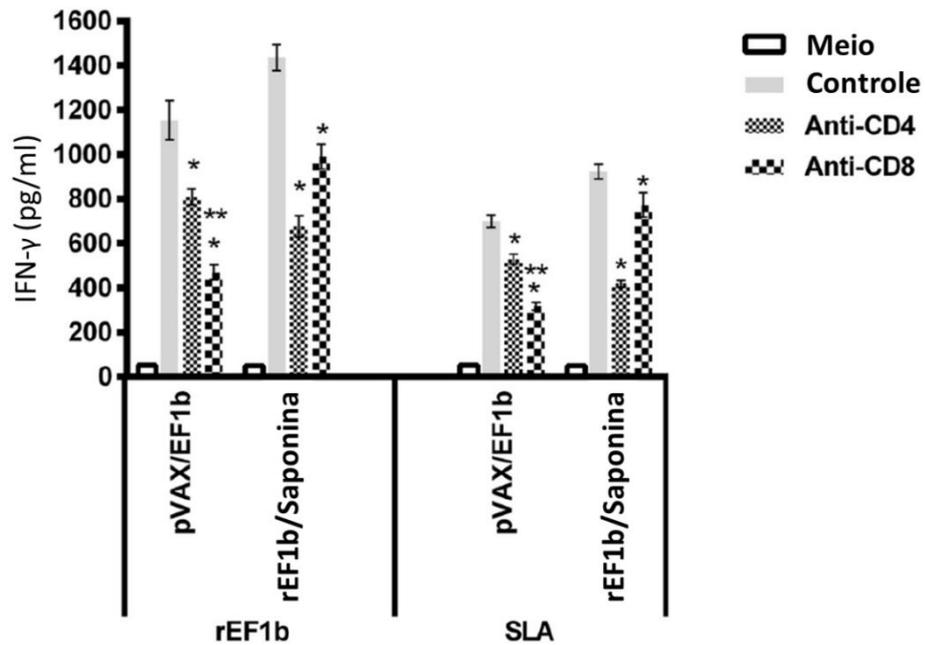


Figura 24. Envolvimento de células T na produção de IFN- γ nos animais vacinados e infectados. Camundongos (n=8 por grupo) foram vacinados e infectados com promastigotas de *L. infantum*. Quarenta e cinco dias após a infecção, eles foram eutanasiados e seus baços coletados. Os esplenócitos (5×10^6 células por mL) foram incubadas em RPMI 1640 completo e deixadas sem tratamento (meio) ou estimuladas com rEF1b ou SLA (10 e 50 μ g/mL, respectivamente), na ausência ou presença de anticorpos monoclonais contra moléculas CD4 e CD8 por 48 h a 37°C em 5% (v/v) de CO₂. Os níveis de IFN- γ foram medidos nos sobrenadantes das culturas por ELISA de captura. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao uso de anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 (P <0,05). (**) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao uso do anticorpo monoclonal anti-CD8 (P <0,05).

Além da análise da origem do IFN- γ na resposta imunológica gerada pelas imunizações, um dos seus papéis mais importante foi também analisado. A citocina IFN- γ ativa fatores de transcrição nos macrófagos, células infectadas por *Leishmania*, que atuam na síntese de enzimas ligadas à síntese de espécies reativas de oxigênio. A produção de espécies reativas de oxigênio leva a formação de compostos, como o óxido nítrico, que atuam diretamente na morte do parasito^{144,145}. Assim, para evidenciar se a produção da citocina estava ocasionando aumento da atividade das células parasitadas, realizamos a dosagem de nitrito nos sobrenadantes de cultura celular. A figura 25 mostra uma produção elevada de nitrito nos grupos de camundongos imunizados com pVAX/EF1b e rEF1b/saponina, em comparação com

os groups salina, saponina e pVAX. A produção de nitrito nos grupos imunizados com rEF1b/saponina foi maior e mais significativa em relação à imunização com pVAX/EF1b.

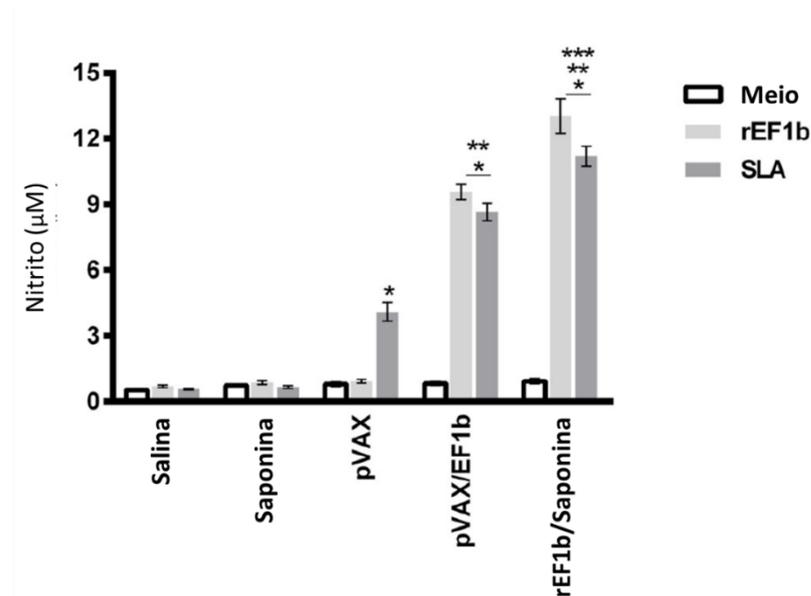


Figura 25. Produção de nitrito após a infecção desafio. Camundongos (n=8 por grupo) foram vacinados e desafiados com promastigotas de *L. infantum* e, 45 dias após a infecção, eles foram eutanasiados e seus baços foram coletados. As células (5×10^6 por mL) foram incubadas em RPMI 1640 completo e deixadas sem tratamento (meio) ou estimuladas com rEF1b ou SLA (10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) por 48 h a 37°C em 5 % (v/v) CO_2 . A produção de nitrito foi medida nos sobrenadantes de cultura pela reação de Griess. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos de solução salina e saponina ($P < 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo pVAX ($P < 0,05$). (***) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo pVAX/EF1b ($P < 0,05$).

A análise da resposta humoral dos camundongos após a infecção apresentou resultados similares em relação às análises antes da infecção, ao mostrar que a imunização com rEF1b/saponina induziu níveis mais elevados de anticorpos do isotipo IgG2a anti-rEF1b, em comparação com os níveis de IgG1 (figura 26). Entretanto, o grupo vacinado com pVAX/EF1b também apresentou produção menor em relação à vacinação com rEF1b/saponina, mas significativa em relação aos grupos salina, saponina e pVAX.

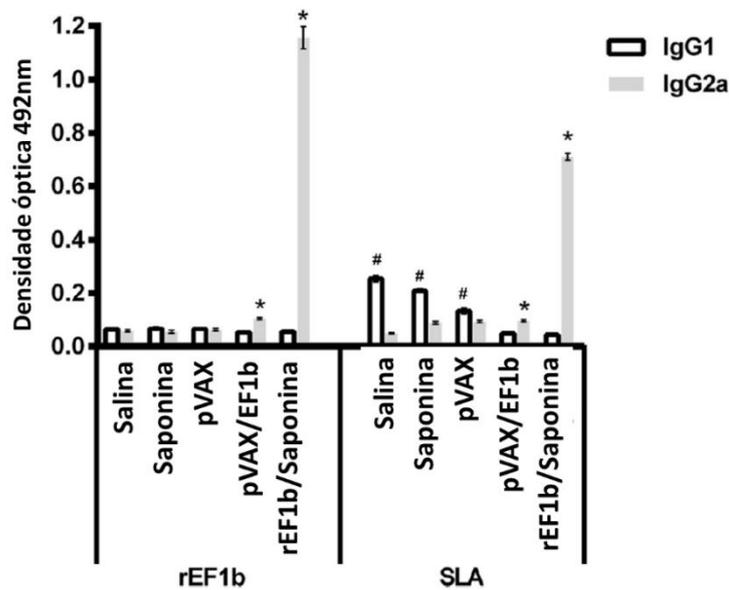


Figura 26. Resposta humoral induzida após a infecção com *L. infantum*. Camundongos imunizados (n=8 por grupo) infectados com promastigotas de *L. infantum* foram eutanasiados 45 dias após o desafio e suas amostras de soro foram coletadas. Os níveis dos isotipos IgG1 e IgG2a anti-rEF1b e anti-SLA foram medidos por ensaio de ELISA. As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos solução salina, saponina e pVAX ($P < 0,05$). (#) indicam diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos pVAX/EF1b e rEF1b/Saponina ($P < 0,05$).

6.4.4 Avaliação da carga parasitária nos órgãos dos animais infectados

A carga parasitária foi analisada 45 dias após a infecção desafio nos diferentes grupos de animais imunizados. Como pode ser visto na figura 27, houve maior redução da carga parasitária nos grupos imunizados com pVAX/EF1b e rEF1b/saponina em relação aos grupos controles (salina, saponina e pVAX). O grupo imunizado com rEF1b/saponina apresentou as maiores reduções da carga parasitária, quando comparado aos valores obtidos no grupo imunizado com pVAX/EF1b.

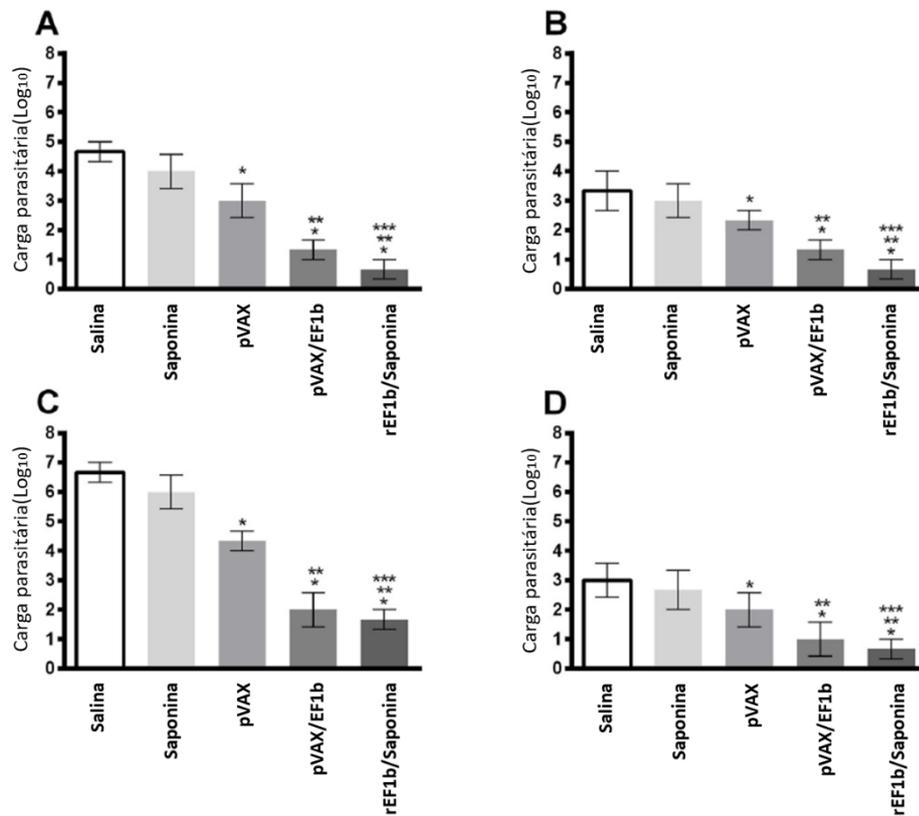


Figura 27. Avaliação da carga parasitária. Camundongos vacinados e infectados (n=8 por grupo) foram eutanasiados 45 dias após o desafio, quando seus órgãos foram coletados para estimativa da carga parasitária pela técnica de diluição limitante. Os resultados foram expressos como log do título ajustado por miligrama de: baço (A), fígado (B), linfonodos drenantes (C) e medula óssea (D). As barras indicam a média \pm desvio padrão dos grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos solução salina e saponina ($P < 0,05$). (**) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo pVAX ($P < 0,05$). (***) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo pVAX/EF1b ($P < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

O diagnóstico das leishmanioses ainda se faz desafiador, uma vez que os testes apresentam uma baixa sensibilidade ao diagnosticar indivíduos com baixa carga parasitária ou sorologia antileishmanial, e uma baixa especificidade ao gerar resultados falso-positivos com doenças que causam reatividade cruzada com antígenos de *Leishmania*; além da dificuldade de separar pacientes tratados e curados dos não tratados^{85,92,146}. Diante dessas limitações, a busca por antígenos mais refinados continua e novas proteínas antigênicas do parasito estão sendo avaliadas como ferramentas diagnósticas para tentar solucionar tais problemas¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Até o momento, parece provável que nem o conteúdo gênico, nem a expressão gênica são particularmente relevantes para as diferenças fenotípicas nas distintas formas morfológicas das espécies de *Leishmania*, mas o controle do processo de tradução e a estabilidade da proteína parecem ser importantes nessa caracterização¹⁴⁹. Dessa forma, nosso grupo tem buscado alvos a partir da imunoproteômica⁵⁶. Recentemente, um estudo imunoproteômico foi realizado utilizando extratos proteicos de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* e soros de pacientes com LV, que reconheceram proteínas do tipo fatores de alongamento em ambas as formas do parasito^{130,150}.

Fatores de alongamento são genes conservados encontrados em distintos organismos, eucariotos e procariotos, apresentando funções biológicas relevantes, como tradução da informação genética do DNA em proteínas¹⁵¹. Essa família de genes codifica proteínas expressas em ambas as formas do parasito e foram encontrados em níveis elevados nas espécies de *Leishmania* resistentes a antimoniais pentavalentes, *L. donovani*, *L. panamensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*; demonstrando a possibilidade de serem usados como possíveis alvos de drogas antiparasitárias¹⁵²⁻¹⁵⁵. Essa família de proteínas foi também identificada em extratos de *Leishmania donovani*, quando amostras de urinas de pacientes com LV foram usados, possibilitando o uso desses antígenos como biomarcadores para um teste diagnóstico não invasivo¹⁵⁶.

Diante da possibilidade de utilização dessas proteínas como alvos biológicos contra as leishmanioses, no presente estudo, utilizamos a proteína rEF1b com o objetivo de melhorar a especificidade e sensibilidade dos métodos de diagnóstico atuais. Ao utilizamos a proteína recombinante EF1- β para ser testada em ensaios de ELISA para o diagnóstico sorológico das leishmanioses em humanos, a proteína foi reconhecida por soros de pacientes com ambas as formas da doença: visceral e tegumentar (cutânea e mucosa). Além disso, a proteína apresentou baixa reatividade com soros de indivíduos sadios e pacientes com doença de Chagas, malária,

tuberculose, paracoccidiodomicose, hanseníase e aspergilose. Esses resultados foram condizentes com o alinhamento das sequências proteicas homólogas à EF1- β , onde foi possível identificar alta similaridade nas sequências de outras espécies de *Leishmania*, além de baixa homologia com proteínas da espécie *Trypanosoma cruzi* e hospedeiros vertebrados, como cão e homem.

De modo distinto, os resultados apontaram que ao utilizar como amostra antigênica o SLA, não houve a identificação de pacientes com LC, e uma maior reatividade com amostras de outras doenças foi encontrada. Em relação aos testes sorológicos em cães, a rEF1- β também foi reconhecido por soros de cães sintomáticos e assintomáticos para as leishmanioses, apresentou uma baixa reatividade contra soros de cães saudáveis e vacinados com Leish-Tec®, bem como daqueles infectados com *T. cruzi*, *B. canis* e *E. canis*. Por outro lado, o ELISA utilizando o SLA não conseguiu detectar os casos assintomáticos para as leishmanioses, e apresentou uma alta reatividade com outras doenças que podem gerar reação cruzada.

Avaliações sorológicas em pacientes curados e tratados são importantes de serem realizadas, pois podem constituir um parâmetro adicional de cura dos pacientes que passaram pelo tratamento das leishmanioses. Neste estudo, ao avaliarmos os níveis de anticorpos específicos para rEF1- β em soros de pacientes tratados com a forma visceral e mucocutânea da doença verificamos uma diminuição dos níveis de anticorpos anti-rEF1 β em relação aos soros dos pacientes coletados antes do tratamento. Por outro lado, níveis semelhantes de anticorpos antileishmanial foram encontrados antes e depois do tratamento, quando o SLA foi usado como antígeno. Este resultado é interessante, uma vez que testes de diagnóstico atuais para leishmaniose humana mostram sensibilidade variável ao monitorar o tratamento e a cura dos pacientes, bem como para diferenciar entre infecções passadas e ativas^{64,157,158}. A proteína rEF1- β foi capaz de identificar pacientes com doença ativa, assim, permitindo inferir sobre seu papel no prognóstico da leishmaniose humana.

Neste estudo, temos como limitação o uso de um painel sorológico reduzido, tanto nas amostras de cães quanto na de humanos, e nas outras doenças que podem causar reação cruzada com as leishmanioses. Além disso, a ausência de acompanhamento sorológico de pacientes com LC também se apresenta como limitação, uma vez que tais pacientes, quanto aos seus aspectos clínicos e práticos, podem apresentar dados prognósticos mais informativos do que os pacientes com a forma mucosa.

Assim sendo, a rEF1- β mostrou pela primeira vez seu papel antigênico para detectar casos de leishmaniose sintomática e assintomática, com valores elevados de sensibilidade e especificidade em amostras de soros de cães e humanos infectados com *L. infantum*; além da

possibilidade de ser utilizada como biomarcador para monitorar o progresso do tratamento e cura da doença humana. Sabemos que novos estudos são necessários, mas estes resultados apontam que rEF1- β poderia ser considerada como um marcador diagnóstico promissor.

Em alguns trabalhos, a proteína EF-1 também apresentou um importante papel imunogênico em modelos murinos contra a infecção por *Leishmania*, bem como quando PBMCs estimulados de pacientes infectados com *L. donovani* produziram um repertório de citocinas do tipo Th1 no sobrenadante das culturas^{83,86}. Portanto, tais estudos sugerem um papel dessa família de proteínas como possíveis candidatos a vacinas contra a leishmaniose. Muitos trabalhos buscam alvos na forma promastigota do parasito, por ser a forma infectante do parasito e que entra em primeiro contato com o hospedeiro. Em vista disso, é importante ressaltar que essa proteína foi encontrada não apenas na forma promastigota, mas também em amastigotas. É evidente que a forma amastigota deveria ser também considerada na busca por alvos biológicos, uma vez que se apresenta presente poucas horas depois da infecção no hospedeiro vertebrado, sendo também responsável pela forma ativa da doença e, conseqüentemente, em constante contato com o sistema imune^{73,85,159}.

Neste trabalho, avaliamos a imunogenicidade da proteína rEF1- β como antígeno quando administrado como vacina de DNA e como proteína recombinante associada à saponina como adjuvante, uma vez que ambas estratégias demonstram ativar um perfil de citocinas Th1^{114,119,143}. Comparamos também ambas as estratégias de imunização, principalmente, devido à escassez de estudos na literatura utilizando essa abordagem experimental^{63,133}.

De uma perspectiva evolutiva, é importante notar que a espécie humana se adaptou continuamente às doenças ao longo do tempo. Além disso, algumas gerações de pessoas podem ter sido sensíveis à leishmaniose, enquanto outras podem ter sido resistentes. E isso ocorre até hoje, mas não sabemos se isso também acontecia nos tempos antigos ou se a leishmaniose na verdade dizimava populações humanas. Alguns estudos paleoparasitológicos sugerem que o parasito surgiu primeiramente em relação aos seus hospedeiros invertebrados e vertebrados, e que se iniciou como uma doença parasitária que se seguiu coevoluindo, em equilíbrio, com seus hospedeiros. Esta teoria de manutenção do hospedeiro pelo parasito é chamado de “Teoria da Rainha Vermelha” e explica a manutenção de vários parasitos^{15,160}. Os parasitos coevoluiram com seus hospedeiros e apresentam atualmente diversos mecanismos de evasão do sistema imune. Essas estratégias de evasão parasitária podem alterar a resposta protetora de hospedeiros infectados resultando no desenvolvimento de doenças ativas, como as induzidas pelos fatores de virulência de *Leishmania*^{161,162}.

Sabe-se que a resposta celular é importante na proteção dos hospedeiros para combater a infecção causada por *Leishmania*, em que a expansão clonal de células T polarizadas para o perfil Th1 e a produção das principais citocinas do perfil, como IFN- γ , IL-2, IL-12, GM-CSF atuam na ativação dos macrófagos, aumentando a atividade fagocítica e de produção de espécies reativas de oxigênio^{163,164}. Esse perfil de resposta é essencial para a proteção do hospedeiro contra o parasito. Do contrário, o parasito pode evadir do sistema imune e se multiplicar no interior das células do hospedeiro, causando a sintomatologia da doença¹⁶⁵.

Níveis elevados de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF foram encontrados nos sobrenadantes celulares de células do baço estimuladas por proteína ou SLA de ambos os grupos rEF1- β /saponina e pVAX/EF1- β , evidenciando a indução de uma resposta celular protetora do tipo Th1. Em concordância com esse perfil, os soros coletados dos animais desses grupos apresentaram aumento do isotipo IgG2a, e maiores razões entre IgG2a e IgG1, indicando também a resposta do tipo Th1. De modo distinto, foi observada uma resposta do tipo Th2, nos grupos controles, de acordo com o desenvolvimento da doença após a infecção. Dessa forma, a progressão da doença nesse modelo foi associada à supressão da resposta Th1, devido à redução da produção de IL-12 e IFN- γ pelos esplenócitos, com um aumento das citocinas IL-4 e IL-10¹⁶⁶.

O sucesso de um candidato vacinal depende do antígeno definido, sistema de distribuição, adjuvante imunológico e via de imunização. As proteínas recombinantes foram amplamente testadas como antígenos de vacinas de segunda geração para proteger contra a LV^{63,167,168}, pois se apresentam com vantagem na padronização e pureza para a sua produção. No entanto, há um grau variável de sucesso no desenvolvimento dessas vacinas devido a escolha do adjuvantes a ser utilizado, pois esses antígenos recombinantes geralmente apresentam imunogenicidade limitada^{73,169}. Alguns estudos mostram que a administração de fatores de virulência de *Leishmania*, como LACK^{114,123} e KMP-11^{171,172}, mostram estar implicadas na produção de citocinas do tipo Th2 quando administradas isoladamente, sem a presença de adjuvantes. No entanto, quando esses alvos foram associados a adjuvantes, uma alteração no perfil imunológico foi gerada, levando ao desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora contra a infecção^{173,174}.

Dessa forma, para uma imunização bem sucedida, que induza proteção contra as leishmanioses, é necessário que seja feita a escolha de um adjuvante apropriado para que atuem em conjunto com os alvos vacinais no desencadeamento da resposta imune protetora contra as leishmanioses^{133,175,176}. No presente trabalho, associamos a proteína recombinante ao adjuvante saponina, um glicosídeo proveniente do metabolismo secundário vegetal muito utilizado por

induzir um perfil de resposta Th1 nos modelos animais ¹³⁴. Corroborando tais achados, a imunização com proteína rEF1- β sem adjuvante induziu uma baixa resposta do tipo Th1.

Em nosso estudo, rEF1b se mostrou imunogênica quando usado como estímulo para culturas de PBMCs de indivíduos saudáveis e pacientes tratados, produzindo níveis elevados de IFN- γ e baixos níveis de IL-10. Além disso, também foi observada linfoproliferação positiva, fortalecendo o uso de EF1- β em estudos futuros para sua validação completa como vacina candidata contra a LV humana. A recuperação da doença geralmente confere imunidade contra a reinfecção pelo parasito. Na verdade, indivíduos saudáveis que vivem em regiões endêmicas da doença, ou aqueles assintomáticos, podem desenvolver uma resposta imune específica do parasito e ser protegidos contra infecções ^{86,177}. Assim, uma justificativa para pesquisar novos candidatos a vacinas humanas poderia ser o uso de culturas de PBMCs de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados com *Leishmania*, com o objetivo de prever a imunogenicidade de tais antígenos quando em contato com as células da imunidade ^{83,178}.

Vacinas de DNA são plasmídeos recombinantes de expressão em eucariotos, que apresentam em sua sequência motivos de CpGs que atuam como adjuvantes na resposta imune e podem ser empregados na sua forma simples, de DNA livre, ou através do uso de carreadores¹⁷⁹. Esses plasmídeos, uma vez internalizados, no interior da célula utilizam toda a maquinaria de expressão gênica do núcleo para síntese proteica. Essas proteínas no citosol passam pela via do proteossoma e são apresentadas via MHC-I, e podem também, por apresentação cruzada, serem englobadas por vesículas e apresentadas via MHC-II ^{163,180,181}.

Neste trabalho, a imunização com pVAX/EF1 β induziu o desenvolvimento de uma resposta celular e humoral do tipo Th1, antes e após a infecção, com correspondentes níveis menores de parasitismo em órgãos distintos dos camundongos imunizados. No entanto, uma maior proteção parasitológica e imunológica foi induzida pela imunização com a proteína recombinante associada ao adjuvante saponina, sugerindo que a estratégia de vacinação com o plasmídeo de DNA poderia ser potencialmente otimizada, com o uso de carreadores, por exemplo, para aumentar a eficácia em modelos de mamíferos¹⁸².

As limitações desta parte do estudo incluem a falta de análises experimentais com esquemas de imunização mais longos para otimizar a eficácia da vacina de DNA plasmidial, bem como estudos para avaliar a memória imunológica a longo prazo induzida pela vacinação com a proteína recombinante mais adjuvante e o plasmídeo de DNA. No entanto, os dados apresentados aqui sugerem a capacidade da proteína EF1- β em estimular uma resposta imunológica protetora contra a infecção causada por *L. infantum* e, portanto, esse antígeno

merece consideração para estudos futuros sobre sua atividade associada a adjuvantes para o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses.

8 CONCLUSÃO

Os resultados descritos no presente estudo indicam que a proteína EF1b poderia ser considerada como um possível marcador diagnóstico e prognóstico para as leishmanioses tegumentar e visceral, além de candidato à vacina para proteção contra a infecção causada por *L. infantum*.

9 PERSPECTIVAS

❖ Testar a proteína rEF1 β em fitas de imunocromatografia para o diagnóstico rápido das leishmanioses;

❖ Avaliar a proteína recombinante mais saponina para a proteção de modelos murinos contra a LT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garg, R. & Dube, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* **123**, 439–454 (2006).
2. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 22–26 (2010) doi:10.1038/nrmicro1766.
3. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7**, (2012).
4. Desjeux, P. Leishmaniasis. *Nature reviews. Microbiology* vol. 2 692 (2004).
5. Who, W. H. O. Leishmaniasis: Situation and trends. http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ (2017).
6. McMahon-Pratt, D. & Alexander, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol. Rev.* **201**, 206–224 (2004).
7. WHO. Leishmaniasis: Epidemiologic situation. (2017).
8. Who, W. H. O. Leishmaniasis: what is leishmaniasis? (2017).
9. Okwor, I. & Uzonna, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **94**, 489–493 (2016).
10. Americana, T. *Tegumentar americana*. (2007).
11. Rodgers, M. R., Popper, S. J. & Wirth, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. *Exp. Parasitol.* **71**, 267–275 (1990).
12. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J. & Arenas, R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* **6**, 750 (2017).
13. Neves, D. P., Melo, A. L. de;, Linardi, P. M. & Vitor, R. W. A. Gênero Leishmania. in *Parasitologia Humana* (eds. Michalik, M. S. M. & Ribeiro, R.) 41–48 (2011).
14. Neves, D. P., Melo, A. L. de;, Linardi, P. M. & Vitor, R. W. A. *Parasitologia Humana*. (2011).
15. Tuon, F. F., Amato Neto, V. & Sabbaga Amato, V. Leishmania: Origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **54**, 158–166 (2008).
16. Lainson, R. & Rangel, B. F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **100**, 811–827 (2005).
17. Mauricio, I. L., Howard, M. K., Stothard, J. R. & Miles, M. A. Genomic diversity in the

- Leishmania donovani* complex. *Parasitology* **119** (Pt 3, 237–246 (1999).
18. Cupolillo, E., Noyes, H., Momen, H. & Jr, G. G. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **16**, 0–2 (2000).
 19. Akhoundi, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–40 (2016).
 20. Sereno, D. *Leishmania* (*Mundinia*) spp .: from description to emergence as new human and animal *Leishmania* pathogens. *New Microbes New Infect.* **30**, 100540 (2019).
 21. Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G. & Shaw, J. J. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. 1–13 (2016) doi:10.1017/S0031182016002092.
 22. Albertos-Alpuche, N. E. vectores de la Leishmaniasis cutanea en Mexico. *Revista Biomédica* vol. 2 92–102 (1990).
 23. Overath, P., Haag, J., Lischke, A. & O’huigin, C. The surface structure of trypanosomes in relation to their molecular phylogeny. *Int. J. Parasitol.* **31**, 468–471 (2001).
 24. Lipoldová, M. & Demant, P. Genetic susceptibility to infectious disease: Lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 294–305 (2006).
 25. Jain, K. & Jain, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis : A review. *J. Immunol. Methods* **422**, 1–12 (2015).
 26. Hardee, D. D. & Herzog, G. A. and Control. *Proceedings, Beltwide Cott. Conf.* **2**, 643–669 (1996).
 27. Gontijo, C. M. F. & Melo, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* **7**, 338–349 (2004).
 28. Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L. & Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**, 566–567 (1988).
 29. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. & Nieto, J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* **57**, 1–88 (2004).
 30. Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G. & Baneth, G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* **24**, 371–377 (2008).
 31. Vijayakumar, S. & Das, P. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. *Acta Trop.* **181**, 95–104 (2018).
 32. ULIANA, S. R. B., TRINCONI, C. T. & COELHO, A. C. Chemotherapy of

- leishmaniasis: present challenges. *Parasitology* **145**, 464–480 (2018).
33. Who, W. H. O. Leishmaniasis: Key facts. (2019).
 34. Tonomura, Y. *et al.* Amphotericin B-induced nephrotoxicity: Characterization of blood and urinary biochemistry and renal morphology in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* **28**, 293–300 (2009).
 35. Prentice, H. G. *et al.* A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients. *Br. J. Haematol.* **98**, 711–718 (1997).
 36. Sundar, S., Singh, O. P. & Chakravarty, J. Visceral leishmaniasis elimination targets in India, strategies for preventing resurgence. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **16**, 805–812 (2018).
 37. Sereno, D., Harrat, Z. & Eddaikra, N. Meta-analysis and discussion on challenges to translate Leishmania drug resistance phenotyping into the clinic. *Acta Trop.* **191**, 204–211 (2019).
 38. Chappuis, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 873–882 (2007).
 39. Ashford, R. W., Desjeux, P. & deRaadt, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol. Today* **8**, 104–105 (1992).
 40. Badaro, R. *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **154**, 1003–1011 (1986).
 41. Ministério da Agricultura, P. e A. Nota Técnica Nº 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa. *Autorização para uso milteforan no Trat. leishmaniose Visc. canina* **11**, 1 (2016).
 42. Pessoa-e-Silva, R. *et al.* The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. *Exp. Parasitol.* **199**, 9–16 (2019).
 43. da Rocha, I. C. M. *et al.* Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of *Leishmania infantum* infection. *Parasit. Vectors* **11**, 586 (2018).
 44. Malla, N. & Mahajan, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. *Indian J. Med. Res.* **123**, 267–274 (2006).
 45. Rita, D. E. S. (K-OTHRINE CE) NO CONTROLE DE LUTZOMYIA LONGIPALPIS (DIPTERA : PSYCHODIDAE), NO MUNICÍPIO. **26**, 15–18 (1993).
 46. Romero, G. A. S. & Boelaert, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e584 (2010).
 47. Werneck, G. L. *et al.* Effectiveness of insecticide spraying and culling of dogs on the

- incidence of *Leishmania infantum* infection in humans: a cluster randomized trial in Teresina, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3172 (2014).
48. Vicente, C. R. & Falqueto, A. Differentiation of mucosal lesions in mucocutaneous leishmaniasis and paracoccidioidomycosis. *PLoS One* **13**, 1–8 (2018).
 49. Soto, L. A. *et al.* Leprosy associated with atypical cutaneous leishmaniasis in Nicaragua and Honduras. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 1103–1110 (2017).
 50. Thakur, S., Joshi, J. & Kaur, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J. Parasit. Dis.* **44**, 253–272 (2020).
 51. Brasil. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde* vol. 1ª edição (2006).
 52. Ereqat, S., Azmi, K., Baneth, G., Jaffe, C. L. & Abdeen, Z. SEROLOGICAL SURVEY WITH PCR VALIDATION FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN NORTHERN PALESTINE SEROLOGICAL SURVEY WITH PCR VALIDATION FOR CANINE VISCERAL. **92**, 178–183.
 53. Bern, C., Jha, S. N., Joshi, A. B., Thakur, G. D. & Bista, M. B. USE OF THE RECOMBINANT K39 DIPSTICK TEST AND THE DIRECT AGGLUTINATION TEST IN A SETTING ENDEMIC FOR VISCERAL LEISHMANIASIS IN NEPAL. **63**, 153–157 (2000).
 54. Kobets, T., Grekov, I. & Lipoldova, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Curr. Med. Chem.* **19**, 1443–1474 (2012).
 55. Chowdhury, M. S., el Harith, A., al Massum, A., al Karim, E. & al Rahman, A. Prevalence of agglutinating anti-*Leishmania* antibodies in two multi-thousand Bengoli communities. *Parasitol. Res.* **79**, 444–450 (1993).
 56. Desjeux, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* **14**, 417–423 (1996).
 57. Ah, M. S., El-tourn, I. A., Satti, M. & Ghalib, H. W. Kala-azar : a comparative study of parasitological agglutination test in diagnosis methods and the direct. (1992).
 58. Farahmand, M. & Nahrevanian, H. Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. *Iran. Biomed. J.* **20**, 128–134 (2016).
 59. Kalayou, S. *et al.* Serological evidence of *Leishmania donovani* infection in apparently healthy dogs using direct agglutination test (DAT) and rk39 dipstick tests in Kafta Humera, north-west Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* **58**, 255–262 (2011).

60. Elmahallawy, E. K. *et al.* Diagnosis of leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.* **8**, 961–972 (2014).
61. Boelaert, M. *et al.* A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**, 72–77 (2004).
62. Badaro, R., Reed, S. G. & Carvalho, E. M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**, 480–484 (1983).
63. Ribeiro, P. A. F. *et al.* A conserved *Leishmania* hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **92**, 196–203 (2018).
64. Dhom-Lemos, L. *et al.* *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS One* **14**, 1–17 (2019).
65. Lima, M. P. *et al.* Diagnostic application of recombinant *Leishmania* proteins and evaluation of their in vitro immunogenicity after stimulation of immune cells collected from tegumentary leishmaniasis patients and healthy individuals. *Cell. Immunol.* **334**, 61–69 (2018).
66. Belli, A., Rodriguez, B., Aviles, H. & Harris, E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**, 102–109 (1998).
67. Sundar S, R. M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* **9**, 951–8 (2002).
68. Reithinger, R., Espinoza, J. C., Courtenay, O. & Davies, C. R. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1486–1493 (2003).
69. Celeste, B. J., Angel, S. O., Castro, L. G. M., Gidlund, M. & Goto, H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **37**, 1591–1593 (2004).
70. Kaur, J., Kaur, T. & Kaur, S. Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. *Acta Trop.* **119**, 50–56 (2011).
71. Carvalho, A. M. R. S. *et al.* An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in

- dogs and humans. *Cell. Immunol.* **318**, 42–48 (2017).
72. Maia, Z. *et al.* Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
 73. Fernandes, A. P., Coelho, E. A. F., Machado-Coelho, G. L. L., Junior, G. G. & Gazzinelli, R. T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 476–485 (2012).
 74. Burns, J. M. J. *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 775–779 (1993).
 75. Figueiredo, F. B. *et al.* Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, e180260 (2018).
 76. Mendonca, I. L. de *et al.* Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **50**, 483–488 (2017).
 77. Bezerra, G. S. N., Barbosa, W. L., Silva, E. D. da, Leal, N. C. & Medeiros, Z. M. de. Urine as a promising sample for *Leishmania* DNA extraction in the diagnosis of visceral leishmaniasis – a review. *Brazilian J. Infect. Dis.* 1–10 (2019) doi:10.1016/j.bjid.2019.04.001.
 78. Oliveira, D., Werneck, G. L. & Rabello, A. Budgetary impact of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil Impacto orçamentário dos testes diagnósticos para leishmaniose visceral no Brasil Impacto presupuestario de las pruebas diagnósticas para la leishmaniosis visceral en Brasil. **33**, 1–8 (2017).
 79. Junqueira, M., Gouv[^], L. De, Jos, E., Oliveira, D. & Rabello, A. Comparative evaluation of direct agglutination test , rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. 172–178 (2008) doi:10.1016/j.trstmh.2007.11.004.
 80. Assis, M. De, Rabello, A. & Werneck, G. L. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. **00**, 1–6 (2012).
 81. Series, D. E. Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance.
 82. Peruhype-magalhães, V., Machado-de-assis, T. S. & Rabello, A. for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **107**, 951–952 (2012).
 83. Peruhype-Magalhães, V. *et al.* Immune response in human visceral leishmaniasis: Analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease

- outcome. *Scand. J. Immunol.* **62**, 487–495 (2005).
84. Reithinger, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. *Lancet. Infect. Dis.* **7**, 581–596 (2007).
 85. Duarte, M. C. *et al.* Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* **22**, 1187–1196 (2015).
 86. Botana, L. *et al.* Cellular Markers of Active Disease and Cure in Different Forms of *Leishmania infantum*-Induced Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 381 (2018).
 87. Mniouil, M. *et al.* Comparative evaluation of immunochromatographic dipstick test (ICT) rk39, soluble antigen ELISA and IFAT for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Morocco. *Acta Trop.* **182**, 185–189 (2018).
 88. Chaabouni, A., Boubaker Elandoulsi, R., Mhadhbi, M., Gharbi, M. & Sassi, A. Comparative analysis of the *Leishmania infantum*-specific antibody repertoires and the autoantibody repertoires between asymptomatic and symptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* **261**, 9–17 (2018).
 89. Brasil. *Guia de vigilância em saúde.* (2016).
 90. Zanette, M. F. *et al.* Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* *chagasi* tests in dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **47**, 105–107 (2014).
 91. Solano-Gallego, L. *et al.* Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and *Leishmania* 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasit. Vectors* **7**, 111 (2014).
 92. Carvalho, A. M. R. S., Mendes, T. A. de O., Coelho, E. A. F., Duarte, M. C. & Menezes-Souza, D. New antigens for the serological diagnosis of human visceral leishmaniasis identified by immunogenomic screening. *PLoS One* **13**, e0209599 (2018).
 93. Nunes, C. M. *et al.* Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **24**, 402–409 (2015).
 94. Travi, B. L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F. & Miro, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, e0006082 (2018).
 95. Castellano, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Hum. Immunol.* **70**, 383–390 (2009).
 96. Bogdan, C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens:

- Leishmaniasis as an example. *Cell. Microbiol.* **10**, 1221–1234 (2008).
97. Kedzierski, L. & Evans, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology* **141**, 1544–1562 (2014).
 98. Gonçalves-de-albuquerque, S. C., Pessoa-e-silva, R. & Lays, A. M. The equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on immunopathogenesis of Leishmaniasis. **8**, (2017).
 99. Jin, W. & Dong, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg. Microbes Infect.* **2**, 0 (2013).
 100. Bettelli, E., Korn, T. & Kuchroo, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 652–657 (2007).
 101. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
 102. Curtis S. Florence, PhD1, Gwen Bergen, PhD1, Adam Atherly, PhD2, Elizabeth Burns, MPH1, Judy Stevens, PhD1, and Cynthia Drake, M. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **66**, 693–698 (2018).
 103. Choudhury, R., Das, P., De, T. & Chakraborti, T. 115kDa serine protease confers sustained protection to visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* via IFN- γ induced down-regulation of TNF- α mediated MMP-9 activity. *Immunobiology* **218**, 114–126 (2013).
 104. Duarte, M. C. *et al.* A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from *Leishmania braziliensis* cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Immunobiology* **222**, 251–260 (2017).
 105. Datta, S. *et al.* Radio-attenuated leishmanial parasites as immunoprophylactic agent against experimental murine visceral leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* **130**, 39–47 (2012).
 106. Papadopoulou, B. *et al.* Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioprotein transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect. Immun.* **70**, 62–68 (2002).
 107. Breton, M., Tremblay, M. J., Ouellette, M. & Papadopoulou, B. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* **73**, 6372–6382 (2005).
 108. Duthie, M. S., Raman, V. S., Piazza, F. M. & Reed, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine* vol. 30 134–141 (2013).
 109. Oliva, G. *et al.* A Randomised , Double-Blind , Controlled Efficacy Trial of “ve Dogs Exposed to Two the LiESP / QA-21 Vaccine in Nai *Leishmania infantum* Transmission

- Seasons. **8**, (2014).
110. Martin, V. *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. **45**, 1–15 (2014).
 111. 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.* **165**, 7064–7071 (2000).
 112. Melby, P. C., Yang, J., Zhao, W., Perez, L. E. & Cheng, J. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* **69**, 4719–4725 (2001).
 113. Aguilar-Be, I. *et al.* Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect. Immun.* **73**, 812–819 (2005).
 114. Ferreira, J. H. L. *et al.* Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* **26**, 677–685 (2008).
 115. Stäger, 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.* **165**, 7064–7071 (2000).
 116. Song, H. *et al.* Potential Vaccine Targets against Rabbit Coccidiosis by Immunoproteomic Analysis. **55**, 15–20 (2017).
 117. Mariana, C. *et al.* Identification of Proteins in Promastigote and Amastigote-like *Leishmania* Using an Immunoproteomic Approach. **6**, 1–10 (2012).
 118. Liu, L. *et al.* Identification of common immunodominant antigens of *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* by immunoproteomic analysis. *Oncotarget* **8**, 34935–34945 (2017).
 119. Santos, T. T. O. *et al.* Probing the efficacy of a heterologous *Leishmania/L. Viannia braziliensis* recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of *L. infantum* in BALB/c mice. *Acta Trop.* **171**, 8–16 (2017).
 120. Salles, B. C. S. *et al.* Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. *Immunobiology* **224**, 163–171 (2019).

121. Costa, L. E. *et al.* Leishmania infantum β -tubulin identified by reverse engineering technology through phage display applied as theranostic marker for human visceral leishmaniasis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–16 (2019).
122. Oliveira-da-Silva, J. A. *et al.* Evaluation of Leishmania infantum pyridoxal kinase protein for the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Immunol. Lett.* **220**, 11–20 (2020).
123. Oliveira-da-Silva, J. A. *et al.* Leishmania infantum pyridoxal kinase evaluated in a recombinant protein and DNA vaccine to protects against visceral leishmaniasis. *Mol. Immunol.* **124**, 161–171 (2020).
124. Dias, D. S. *et al.* Recombinant prohibitin protein of Leishmania infantum acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. *Cell. Immunol.* **323**, 59–69 (2018).
125. Martins, V. T. *et al.* Antigenicity and Protective Efficacy of a Leishmania Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, (2013).
126. Lima, M. P. *et al.* Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitol. Res.* **116**, 1197–1206 (2017).
127. Vale, D. L. *et al.* Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic Leishmania infantum proteins. *Vet. Parasitol.* **296**, 109513 (2021).
128. Martins, V. T. *et al.* A recombinant chimeric protein composed of human and cell epitopes protects against visceral leishmaniasis. 1–14 (2017) doi:10.1111/pim.12359.
129. Dias, D. S. *et al.* Vaccination with a CD4(+) and CD8(+) T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from Leishmania infantum proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. *Transl. Res.* **200**, 18–34 (2018).
130. Lage, D. P. *et al.* Screening diagnostic candidates from Leishmania infantum proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach. *Parasitology* **146**, 1467–1476 (2019).
131. Andersen GR1, N. J. Structural studies of eukaryotic elongation factors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **66**, 425–37 (2001).
132. Pérez, J. M. *et al.* The solution structure of the guanine nucleotide exchange domain of human elongation factor 1 β reveals a striking resemblance to that of EF-Ts from Escherichia coli. *Structure* **7**, 217–226 (1999).

133. Agallou, M., Athanasiou, E., Koutsoni, O., Dotsika, E. & Karagouni, E. Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I- and II-restricted epitopes of four known *Leishmania infantum* proteins. *Front. Immunol.* **5**, 1–16 (2014).
134. Fernandes, A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* **26**, 5888–5895 (2008).
135. Lage, P. S. *et al.* Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* **114**, 4625–4635 (2015).
136. Duarte, M. C. *et al.* A vaccine combining two *Leishmania braziliensis* proteins offers heterologous protection against *Leishmania infantum* infection. *Mol. Immunol.* **76**, 70–79 (2016).
137. Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M. & Marcatili, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* **45**, W24–W29 (2017).
138. Jensen, K. K. *et al.* Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology* **154**, 394–406 (2018).
139. Larsen, M. V *et al.* Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics* **8**, 424 (2007).
140. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680 (1994).
141. Zanin, F. H. C. *et al.* 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.* **9**, 1070–1077 (2007).
142. Antonio, E. *et al.* Immune Responses Induced by the. **71**, 3988–3994 (2003).
143. Chávez-Fumagalli, M. A. *et al.* Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. *Microbes Infect.* **12**, 967–977 (2010).
144. Balaraman, S., Tewary, P., Singh, V. K. & Madhubala, R. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 639–647 (2004).
145. Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Kuchipudi, S. V. & Kalangi, S. K. Cytokines: Key

- Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, 670 (2019).
146. Ledesma, D. *et al.* Performance of Leishmania PFR1 recombinant antigen in serological diagnosis of asymptomatic canine leishmaniosis by ELISA. *BMC Vet. Res.* **13**, 1–8 (2017).
 147. Zhang, W. *et al.* Preparation and Mechanical and Thermal Properties of Chlorinated Polyethylene Reinforced Polypropylene Foam. *J. Wuhan Univ. Technol. Mater. Sci. Ed.* **33**, 500–504 (2018).
 148. Nogueira, C. T. *et al.* Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, 197–201 (2018).
 149. Lynn, M. A. & McMaster, W. R. Leishmania: conserved evolution - diverse diseases. *Trends Parasitol.* **24**, 103–105 (2008).
 150. MM., B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **7**, 72:248–54 (1976).
 151. Zheng, C. & Baum, B. J. All human EF1 α promoters are not equal: Markedly affect gene expression in constructs from different sources. *Int. J. Med. Sci.* **11**, 404–408 (2014).
 152. Moreira, D. S. & Murta, S. M. F. Involvement of nucleoside diphosphate kinase b and elongation factor 2 in Leishmania braziliensis antimony resistance phenotype. *Parasites and Vectors* **9**, 1–12 (2016).
 153. Walker, J. *et al.* Discovery of factors linked to antimony resistance in Leishmania panamensis through differential proteome analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **183**, 166–176 (2012).
 154. Matrangolo, F. S. V. *et al.* Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and-susceptible Leishmania braziliensis and Leishmania infantum chagasi lines. *Mol. Biochem. Parasitol.* **190**, 63–75 (2013).
 155. Biyani, N., Singh, A. K., Mandal, S., Chawla, B. & Madhubala, R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of Leishmania donovani. *Mol. Biochem. Parasitol.* **179**, 91–99 (2011).
 156. Ejazi, S. A. *et al.* Immunoproteomic Identification and Characterization of Leishmania Membrane Proteins as Non-Invasive Diagnostic Candidates for Clinical Visceral Leishmaniasis. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
 157. Paz, G. F., Rugani, J. M. N., Marcelino, A. P. & Gontijo, C. M. F. Implications of the

- use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. *Acta Trop.* **182**, 198–201 (2018).
158. Cunningham, J. *et al.* A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **55**, 1312–1319 (2012).
 159. Kaur, S. *et al.* Effect of dose and route of inoculation on the generation of CD4⁺ Th1/Th2 type of immune response in murine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* **103**, 1413–1419 (2008).
 160. Schönian, G. Genetics and Evolution of *Leishmania* parasites. *Infect. Genet. Evol.* **50**, 93–94 (2017).
 161. Kumari, S. *et al.* Th1-stimulatory polyproteins of soluble *Leishmania donovani* promastigotes ranging from 89.9 to 97.1 kDa offers long-lasting protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* **26**, 5700–5711 (2008).
 162. Kushawaha, P. K., Gupta, R., Sundar, S., Sahasrabudhe, A. A. & Dube, A. Elongation Factor-2, a Th1 Stimulatory Protein of *Leishmania donovani* , Generates Strong IFN- γ and IL-12 Response in Cured *Leishmania* -Infected Patients/Hamsters and Protects Hamsters against *Leishmania* Challenge . *J. Immunol.* **187**, 6417–6427 (2011).
 163. Amit, A. *et al.* Immunization with *Leishmania donovani* protein disulfide isomerase DNA construct induces Th1 and Th17 dependent immune response and protection against experimental visceral leishmaniasis in Balb/c mice. *Mol. Immunol.* **82**, 104–113 (2017).
 164. Ferraz Coelho, E. A. *et al.* Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect. Immun.* **71**, 3988–3994 (2003).
 165. Ashford, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1269–1281 (2000).
 166. Bhowmick, S., Mazumdar, T. & Ali, N. Vaccination route that induces transforming growth factor ?? production fails to elicit protective immunity against *leishmania donovani* infection ??? *Infect. Immun.* **77**, 1514–1523 (2009).
 167. Jaiswal, A. K. *et al.* Th1 stimulatory proteins of *Leishmania donovani*: Comparative cellular and protective responses of rTriose phosphate isomerase, rProtein disulfide isomerase and reelongation factor-2 in combination with rHSP70 against visceral leishmaniasis. *PLoS One* **9**, 1–17 (2014).
 168. Khare, P. *et al.* Efficacy of *Leishmania donovani* trypanothione reductase, identified as

- a potent Th1 stimulatory protein, for its immunogenicity and prophylactic potential against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* **113**, 851–862 (2014).
169. Sukumaran, B. & Madhubala, R. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Curr. Mol. Med.* **4**, 667–679 (2004).
 170. Sinha, S., Kumar, A. & Sundaram, S. A comprehensive analysis of LACK (Leishmania homologue of receptors for activated C kinase) in the context of Visceral Leishmaniasis. *Bioinformatics* **9**, 832–837 (2013).
 171. Da Fonseca Pires, S. *et al.* Identification of virulence factors in leishmania infantum strains by a proteomic approach. *J. Proteome Res.* **13**, 1860–1872 (2014).
 172. de Mendonça, S. C. F., Cysne-Finkelstein, L. & Matos, D. C. de S. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in Leishmania. *Front. Immunol.* **6**, 1–6 (2015).
 173. Duarte, M. C. *et al.* Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **49**, 398–407 (2016).
 174. Reguera, R. M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C. & Balaña-Fouce, R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* **227**, 98–114 (2016).
 175. Ribeiro, T. G. *et al.* Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Experimental Parasitology* vol. 143 60–68 (2014).
 176. Costa, L. E. *et al.* Mimotope-based vaccines of leishmania infantum antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. *PLoS One* **9**, (2014).
 177. Vijayamahantesh *et al.* Immuno-informatics based approaches to identify CD8+ T cell epitopes within the Leishmania donovani 3-ectonucleotidase in cured visceral leishmaniasis subjects. *Microbes Infect.* **19**, 358–369 (2017).
 178. Ribeiro, P. A. F. *et al.* Leishmania infantum amastin protein incorporated in distinct adjuvant systems induces protection against visceral leishmaniasis. *Cytokine* **129**, 155031 (2020).
 179. McCallum, I. R. & Matthews, R. Modular Manoeuvring Mathematical Model for Warship Simulation. 175–187 (1985) doi:10.1007/978-3-642-82560-6_17.
 180. Koutsoni, O. S., Barhoumi, M., Guizani, I. & Dotsika, E. New insights on the adjuvant properties of the leishmania infantum eukaryotic initiation factor. *J. Immunol. Res.* **2019**, (2019).
 181. Shahbazi, M. *et al.* Immunological comparison of DNA vaccination using two delivery

- systems against canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* **212**, 130–139 (2015).
182. Wang, Z. B. & Xu, J. Better adjuvants for better vaccines: Progress in adjuvant delivery systems, modifications, and adjuvant–antigen codelivery. *Vaccines* **8**, (2020).

APÊNDICE

APÊNDICE**APÊNDICE I**

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

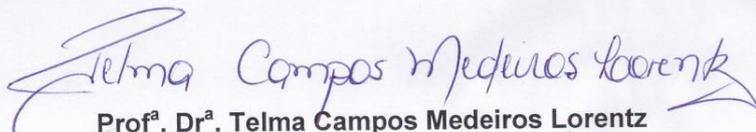
Projeto: CAAE – 32343114.9.0000.5149

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

APÊNDICE II

▶ PLATBR - Comunicado de Início de Projeto ★

▶ **Equipe Plataforma Brasil** <plataformabrasil@saude.gov.br>
Para EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO

Jan 3 em 2:10 AM ★

Sr. (a) Pesquisador (a),

O projeto Avaliação do Perfil Imunológico de Pacientes com Leishmaniose Visceral Internados na Santa Casa Misericórdia de Belo Horizonte com número CAAE 60802116.1.0000.5138, tem data de início prevista para 18/09/2016. Esta mensagem é meramente informativa e baseada na data da primeira etapa descrita no cronograma aprovado. Por favor, ignore-a se não fizer sentido para a corrente situação do projeto de pesquisa.

Atenciosamente,

Plataforma Brasil

www.saude.gov.br/plataformabrasil

plataformabrasil@saude.gov.br

Esta é uma mensagem automática. Favor não responder este e-mail.

Esta mensagem pode conter informação confidencial e/ou privilegiada. Se você não for o destinatário ou a pessoa autorizada a receber esta mensagem, não pode usar, copiar ou divulgar as informações nela contidas ou tomar qualquer ação baseada nessas informações. Se você recebeu esta mensagem por engano, por favor avise imediatamente o remetente, respondendo o e-mail e em seguida apague-o.

◀ Responder ◀◀ Responder a todos ➔ Encaminhar *** Mais

APÊNDICE III

Artigos Decisão do CEUA Certificado CEUA

Escrever Apagar Mover Spam Mais

Entrada (1)

Rascunhos

Enviadas

Spam

Lixeira (51)

Visualizações inteligentes

- Importante
- Não lido
- Favorito
- Pessoas
- Social
- Viagens
- Compras
- Finanças
- (from "Cecilia Perilo" rec..)

Pastas

- Arquivo

Publicidade



Temos vagas de emprego em mais de 37 mil empresas. Assine Catho por 7 dias grátis e conquiste seu emprego.

Certificado CEUA

CEUA <ceua@prpq.ufmg.br>
Para: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br Hoje em 4:57 PM



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 333 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Proteínas selecionadas em Leishmania por imunoproteômica aplicadas: como vacinas contra as leishmanioses tegumentar e visceral", que tem como responsável EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 09/12/2015. Este certificado espira-se em 09/12/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 333 / 2015, related to the Project entitled "Proteins selected in Leishmania by immunoproteomics applied as vaccines against tegumentary and visceral leishmaniasis", under the supervision of EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/12/2015. This certificate expires in 09/12/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 09/12/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

APÊNDICE IV

Artigos publicados no periódico *Microbial Pathogenesis*:

-“*Leishmania infantum* recombinant eukaryotic elongation factor-1 beta protein: a potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans”. *Microb Pathog.* 2019 Dec;137:103783. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103783

-“*Leishmania* eukaryotic elongation Factor-1 beta protein is immunogenic and induces parasitological protection in mice against *Leishmania infantum* infection”. *Microb Pathog.* 2021 Feb;151:104745. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104745.

ANEXO

ANEXO I

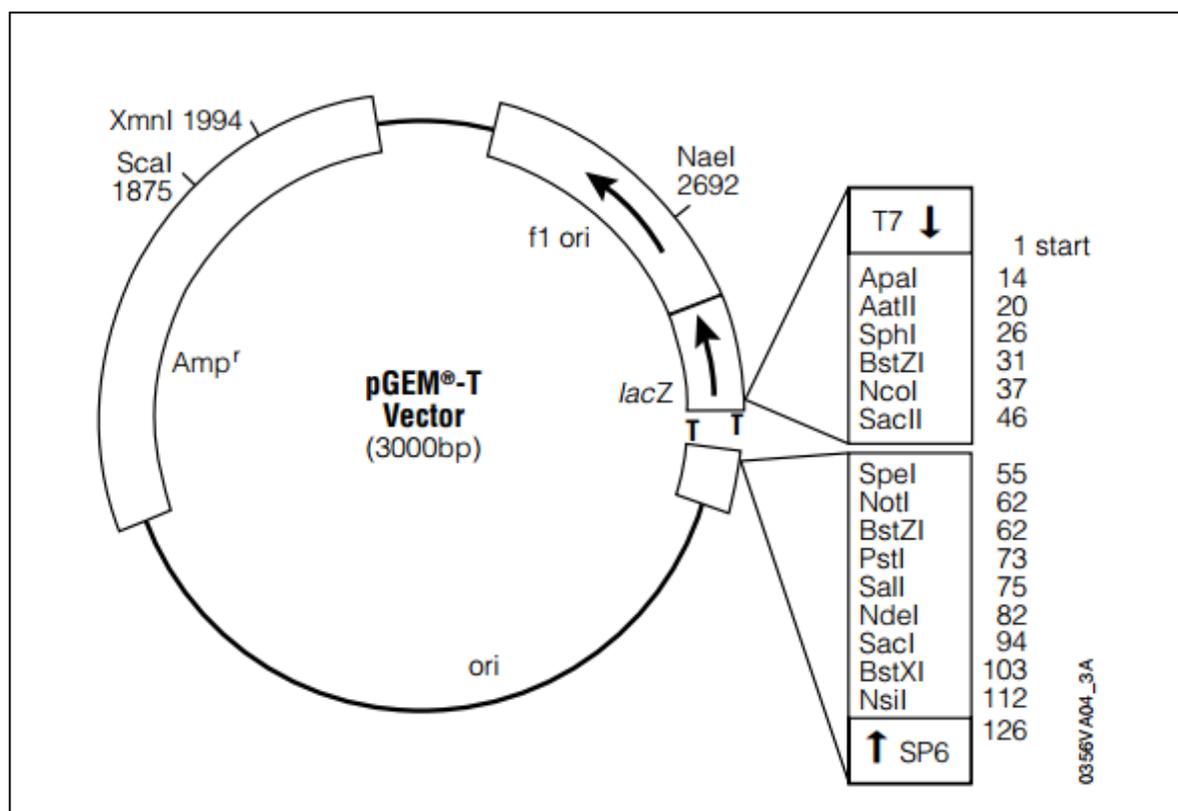


Figura 28 Vetor de clonagem. Vetor de clonagem utilizado para a obtenção da proteína recombinante, p-GEM-T Easy Vector Systems (Promega).

ANEXO II

pET-TEV – 5357pb

* The thrombin recognition site of PET28a (Novagen) was replaced by a TEV protease recognition site

```

XbaI                               NcoI       His tag
aattccccctctagaataaatntcgtttaactttaagaaggagatataccatgggccatcatcatcatcac
ttaaggggagatctttattanagcaaattgaaattcttctctatatggtaaccggtagtagtagtagtagt
MetGlyHisHisHisHisHisHisHisHis

TEV           NdeI           T7 tag           BamHI  EcoRI  SacI
gaaaacctgtatthtcagggccatattggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgcggatccgaattcgagctc
cttttggacataaaaagtcccgggtataccgatcgtactgaccacctgctgtttaccagcgcctaggcttaagctcgag
GluAsnLeuTyrPheGlnGlyHisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeu

Sali  HindIII  Not I   XhoI       His tag
cgtcgacaagcttgcgccgcactcgagcaccaccaccaccaccactgagatccggtcgtctaacaaagcccga
gcagctgttcgaaagccggcgtagctcgtggtggtggtggtggtgactctagccgacgattgtttcgggctt
ArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProProLeuArgSerGlyCysEnd

```

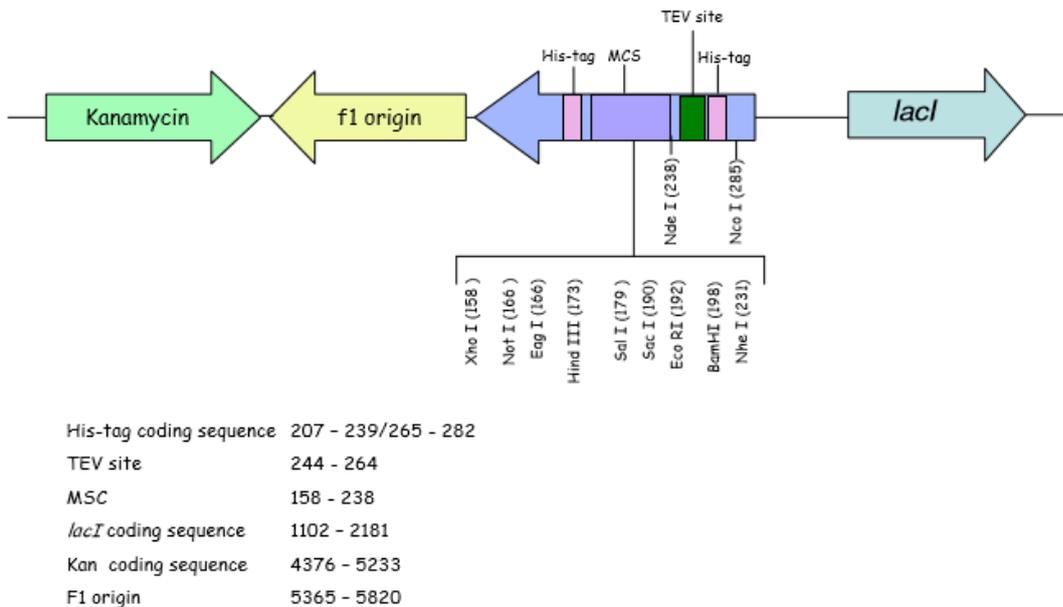
pET28a (+) TEV
5357 bp

Figura 19 Vetor de expressão em procariotos. Vetor utilizado para a obtenção da proteína recombinante em procariotos, pET28a (+) TEV, com cerca de 5.0kb, com 3.0 kb, sítio múltiplo de clonagem para diferentes enzimas de restrição, origem de replicação e um promotor.

ANEXO III

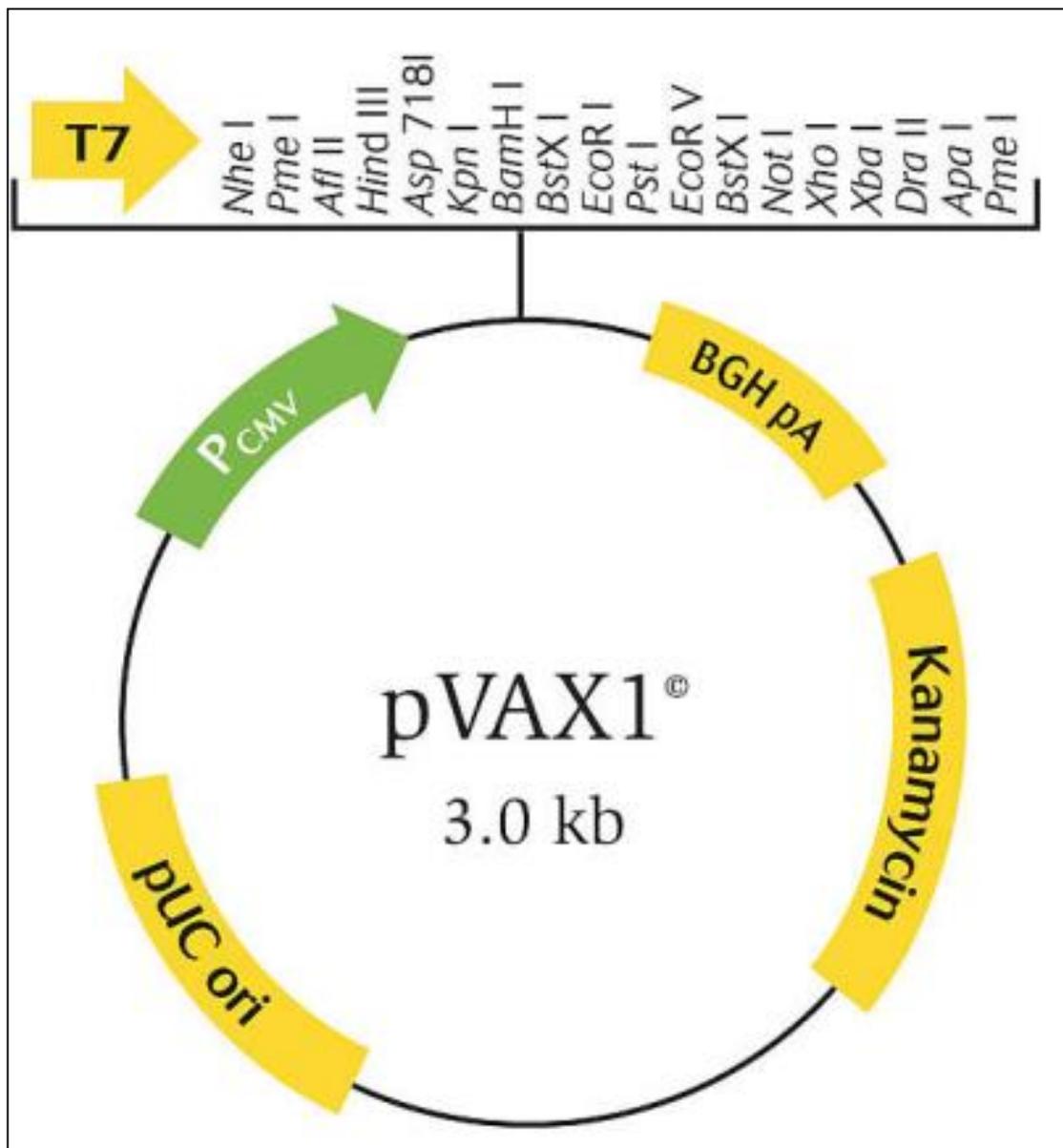


Figura 30 Vetor de expressão em eucariotos. Vetor utilizado para a obtenção da proteína recombinante em eucariotos, pVAX1[®] com 3.0 kb, sítio múltiplo de clonagem para diferentes enzimas de restrição, origem de replicação e um promotor de citomegalovírus reconhecido por eucariotos.