

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Dissertação

**Seleção de Potenciais
Peptídeos para o Diagnóstico
Sorológico da Leishmaniose
Visceral Canina Por
Imunoinformática**

Rodrigo da Costa Maia

Ouro Preto
2021



UFOP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Seleção de Potenciais Peptídeos para o Diagnóstico Sorológico da
Leishmaniose Visceral Canina Por Imunoinformática**

RODRIGO DA COSTA MAIA

Ouro Preto, MG

Maio de 2021

RODRIGO DA COSTA MAIA

**Seleção de Potenciais Peptídeos para o Diagnóstico Sorológico da
Leishmaniose Visceral Canina Por Imunoinformática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto na Área de concentração de Imunobiologia de Protozoários

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

Coorientador: Dr. Rory Cristiane Fortes de Brito

Ouro Preto, MG

Maio de 2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M217s Maia, Rodrigo da Costa .
Seleção de potenciais peptídeos para o diagnóstico sorológico da
Leishmaniose visceral canina por imunoinformática. [manuscrito] /
Rodrigo da Costa Maia. - 2021.
59 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.
Coorientador: Dr. Rory Cristiane Fortes de Brito.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Leishmaniose visceral . 2. Bioinformática. 3. Peptídeos. I. Brito,
Rory Cristiane Fortes de. II. Reis, Alexandre Barbosa. III. Universidade
Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
PRO-REITORIA DE PESQUISA, POS-GRADUACAO E
INOVACAO
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIAS
BIOLOGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigo da Cosa Maia

Seleção de Potenciais Peptídeos para o Diagnóstico Sorológico da Leishmaniose Visceral Canina Por Imunoinformática.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

Aprovada em 29 de Junho de 2021

Membros da banca

Dr. Alexandre Barbosa Reis - Orientador Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. Rory Cristiane Fortes de Brito - Co-Orientador Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Ana Carolina Ramos Guimaraes - Instituto Oswaldo Cruz
Dr. Leandro Marcio Moreira - Universidade Federal de Ouro Preto

Alexandre Barbosa Reis, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 06/10/2021



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Barbosa Reis, COORDENADOR(A) DE CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**, em 06/10/2021, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0229773** e o código CRC **D9310AAF**.

Agradeço a Deus por me guiar por todos os caminhos percorridos;

Aos meus pais, João Batista e Luciana, por serem meus exemplos de vida;

A minha avó, Maria, por ser minha segunda mãe;

Aos meus irmãos, Gustavo e João Pedro por serem minha alegria de cada dia;

Ao meu orientador Alexandre, pela oportunidade e conhecimento que me proporcionou;

Ao meu coorientador Rory, pela paciência e ajuda;

A todos do Laboratório de Imunopatologia, pelo acolhimento e disposição em ajudar quando foi preciso;

Aos meus parceiros, Nathália, Gabriel e Rafael, pelas risadas, alegria e vergonhas;

A Thaís Ostolin, Miriã, Lívia, Luciana e Ana Flávia, pelas conversas científicas e não científicas;

A meus amigos de longa data que levo no coração;

À Universidade Federal de Ouro Preto, pelo acolhimento e disponibilização da estrutura para realização dos experimentos;

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, por inspirar novos pesquisadores;

Às agências de fomento, CAPES, pela concessão da bolsa, e CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro para realização do projeto.

Meu muito obrigado!

Colaboradores:

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis^{1,2,6}

Prof. Dr. Wendel Coura-Vital²,

Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar-Soares^{1,2},

Dr. Rory Cristiane Fortes de Brito

Dr. Jeronimo Conceição Ruiz^{3,4},

Dr. Daniela de Melo Resende^{3,4},

Gabriel José Lucas Moreira¹,

Nathália Caroline Soares¹,

¹ Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

³ Grupo Informática de Biosistemas e Genômica, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

⁵ Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

⁶ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, INCT-DT, Brasil.

Suporte Financeiro

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

INCT-DT - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Apoio: Universidade Federal de Ouro Preto

“Você pode fazer a diferença.

Por vezes não será grandioso e pode até nem ser visível.

Mas será igualmente valioso!”

Comissário Gordon

A Leishmaniose Visceral é uma doença negligenciada, com ampla distribuição geográfica, comportamentos ecoepidemiológicos distintos (zoonótica ou antroponótica) e potencialmente fatal quando não tratada. Nas Américas, assim como em parte da Europa apresenta um comportamento zoonótico ou antroponótico tendo o cão como principal reservatório do parasito (*Leishmania (L.) infantum* e seu diagnóstico, no entanto, apresenta limitações principalmente com relação a especificidade e ou sensibilidade dos testes sorológicos utilizados, como é o caso do programa de controle da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), executado no Brasil. A fim de contribuir na busca por componentes que possam refinar as técnicas de diagnóstico sorológico, no presente estudo, foram selecionados e avaliados o potencial de peptídeos para serem empregados no imunodiagnóstico da LVC. Para isso, foram selecionados e avaliados, a partir de um banco de dados relacional, peptídeos quanto a: escores em algoritmos de predição de epítomos para células B (BepiPred, BCPred12 e AAP12), função biológica das proteínas as quais esses peptídeos pertenciam por meio de redes de interação proteína-proteína, similaridade, por meio do BLASTp, além de Atracagem (CABSdock) e Dinâmica Molecular (GROMACS). Após isso, foi otimizada e padronizada a técnica de ELISA empregando os peptídeos selecionados. Para tal, foram testadas duas concentrações de peptídeos (0,25 e 0,5µg) assim como três diluições de amostra (1:200;1:400 e 1:600) e as seguintes diluições do conjugado IgG de cão (1:16.000;1:20.000 e 1:24.000). Como resultados, foram selecionados dez peptídeos a partir do banco de dados relacional, todos com escores maiores que 0,5 para todos os algoritmos de predição além de não serem componentes de proteínas intracelulares do parasito. A similaridade entre outras espécies do mesmo gênero foi consideravelmente alta, no entanto para parasitos de outros gêneros os peptídeos em sua maioria mostraram-se com baixa similaridade. Quanto a atracagem, somente dois peptídeos foram classificados como bons modelos em se tratando a qualidade, enquanto os outros oito se enquadraram como ótimos modelos. Durante a simulação de dinâmica molecular observamos valores relativamente altos de *Root-Mean-Square Deviation of Atomic Positions* RMSD para todos os peptídeos. Na padronização de ELISA foi possível observar que as melhores condições para as avaliações das amostras individualmente, foram as que empregaram a concentração de 0,25 µg dos peptídeos e em diluição plasmática de 1:600 e do conjugado de 1:16.000, respectivamente, mostraram a capacidade dos peptídeos em diferenciar em no mínimo 3 vezes amostras de cães infectados por *L. infantum* e não infectados. Em suma a seleção dos peptídeos a partir de parâmetros obtidos por bioinformática se mostrou promissora visto o potencial dos peptídeos selecionados, que se apresentavam potenciais para sua utilização futura em teste diagnóstico sorológico de alto desempenho. Neste sentido este trabalho abre perspectivas para prosseguir com estes testes de validação dos antígenos em bancos de soros que possuem diversos perfis de amostras de cães naturalmente infectados, portadores de diferentes manifestações clínicas, cargas parasitárias, antes e após tratamento e intervenção vacinal, ampliando assim as perspectivas de avanços biotecnológicos no campo do diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral em especial para LVC.

Palavras-Chave: *Leishmania infantum*; diagnóstico sorológico; cão; peptídeos sintéticos; bioinformática.

Visceral Leishmaniasis is a zoonotic and potentially fatal disease when not treated. The diagnosis, however, has certain limitations, mainly regarding the specificity and or sensitivity in tests used in disease control programs, such as The Control Program for Canine Visceral Leishmaniasis, performed in Brazil. In order to contribute to the search for components that can refine the serological diagnostic techniques, in the present study, we select and evaluate peptides with potential to be used in the immunodiagnosis of CVL. For this purpose, peptides were selected and evaluated from a relational database regarding: scores in epitope prediction algorithms for B cells (BepiPred, BCPred12 and AAP12), biological function of the proteins through protein-protein interaction networks, similarity, using BLASTp, in addition to Docking (CABSdock) and Molecular Dynamics (GRO-MACS). After that, the ELISA technique was standardized using the selected peptides. Two concentrations of peptides (0.25 and 0.5 μg) were tested every 100 μL , as well as three sample dilutions (1: 200; 1: 400 and 1: 600) and dilution of dog IgG conjugate (1: 16,000; 1: 20,000 and 1: 24,000) As results, ten peptides were selected from the relational database, all with scores greater than 0.5 for all prediction algorithms in addition to not being components of intracellular proteins of the parasite. The similarity between other species of the same genus was considerably high, however for other genera parasites, the peptides mostly showed low similarity. In docking, only two peptides were classified as good models, while the other eight were classified as excellent models. During the simulation of molecular dynamics, we observed relatively high values of RMSD for all peptides. In the ELISA standardization, it was possible to establish the best conditions, then the reactions were performed with 0.25 μg of each peptide and in a dilution of 1: 600 and 1: 16,000 for samples and conjugate, respectively, the data showed the capacity of the peptides to differentiate at least 3 times samples from dogs infected by *L. infantum* and uninfected. Based on that, the selection of peptides through bioinformatics approaches was promising considering the potential of the selected peptides, showing interesting perspectives regarding their use in assays with a greater number and more diverse sample profiles, as well as the use of this method. for prospecting diagnostic test components for other diseases.

Keywords: *Leishmania infantum*; serological diagnosis; dog; synthetic peptides, bioinformatics.

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO- dimetil-sulfóxido

DAT- *Direct Agglutination Test*

DPP[®]- *Dual Path Platform*

CNI- Cães não infectados

CI- Cães infectados

ELISA- *Enzyme Lynked Immunosorbent Assay*

H₂SO₄- Ácido Sulfúrico

IgG- Imunoglobulina da classe G

LC- Leishmaniose Cutânea

LMC- Leishmaniose Mucocutânea

LV- Leishmaniose Visceral

LVC- Leishmaniose Visceral Canina

mg- Miligrama

mL- Mililitro

nm- Nanômetro

NMR- *Nuclear Magnetic Resonance*

OD- *Optical density*

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAHO-*Pan-American Health Orgazination*

PBS- *Phosphate Buffer Salin*

PBD- *Protein Data Bank*

PCR- *Polimerase Chain Reaction*

PCLV- Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PEP- Peptídeo

pH- Potencial hidrogeniônico

PPI- *Protein-protein interaction*

RIFI- Reação de Imunofluorescência Indireta

RMSD- *Root-Mean-Square Deviation of Atomic Positions*

RNA- *Ribonucleic acid*

μL - Microlitro

WHO- *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Delineamento metodológico sintetizando as etapas realizadas durante o estudo.....	31
Figura 2- Proteínas imunogênicas mapeadas por redes de interação proteína-proteína (PPI) .	41
Figura 3- Modelo e validação da estrutura da cadeia pesada gama de imunoglobulina de <i>Canis familiaris</i> após refinamento.	43
Figura 4- Complexos formados a partir do atracamento dos peptídeos e cadeia pesada gama da imunoglobulina de cão..	44
Figura 5- Dinâmica molecular mostrando a estabilidade residual e flutuações i-e (RMSDs).	45
Figura 6- Padronização da reatividade sorológica a fim de avaliar as melhores condições para todos os peptídeos.....	47
Figura 7- Distribuição dos resultados de densidade óptica dos controles negativos e positivos que foram testados usando os diferentes peptídeos.	48
Figura 8- Índice de reatividade para cada peptídeo.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de ferramentas utilizadas nas etapas in sílico durante o estudo.....	32
Tabela 2- Peptídeos componentes das proteínas selecionadas com maiores scores de predição. São mostrados a identificação do peptídeo (ID), sequência proteica, posição, scores de predição e identificação da proteína ao qual pertencem.....	41
Tabela 3- Valores de similaridade obtidos pelo BLASTp de cada peptídeos quando confrontados a proteoma de outras espécies de parasitos. Os asteriscos (*) indicam ausência de sequência similar, os valores de identidade são indicados em porcentagem (%)......	42
Tabela 4- Valores obtidos em densidade ótica na reação ELISA para diferentes concentrações de peptídeo e diluições de soro e conjugado.	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral Humana.....	16
1.2 Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	17
1.3 Diagnóstico clínico e laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	18
1.3.1 Diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	19
1.4 O emprego da Bioinformática (Imunoinformática) na predição de alvos de antígenos para diagnóstico	22
1.4.1 Seleção de epítomos de células B.....	23
1.4.2 Predição de estruturas proteicas	24
1.4.3 Ancoragem molecular	25
1.4.4 Dinâmica molecular	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Delineamento metodológico	31
3.2 Busca no banco de dados relacional.....	32
3.3 Elaboração da rede de interação proteína-proteína	33
3.4 Avaliação de similaridade	33
3.5 Modelagem molecular da cadeia pesada gama do anticorpo IgG de cão	34
3.6 Atracagem molecular.....	34
3.7 Dinâmica molecular	35
3.8 Seleção de amostras de soro canino para prova de conceito sorológico da avaliação potencial dos peptídeos para o diagnóstico da LVC	36
3.9 Síntese dos peptídeos	36
3.10 Padronização da técnica de ELISA	37
3.11 Reação imunoenzimática ELISA.....	37
3.12 Análises estatísticas.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Banco de dados relacional	40
4.2 Elaboração da rede de interação proteína-proteína (PPI).....	40
4.3 Identificação de epítomos e avaliação de similaridade.....	41
4.4 Predição da estrutura tridimensional da porção de IgG canino	42
4.5 Atracagem dos complexos peptídeo-proteína.....	43

4.6 Dinâmica molecular dos complexos peptídeo-proteína	44
4.8 Avaliação da técnica de ELISA utilizando peptídeos para validação do potencial diagnóstico para LVC.....	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO	58
7. PERSPECTIVAS	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
9. ANEXO 1	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral Humana

As leishmanioses compõem um mosaico de manifestações clínicas de doenças causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. As Leishmanioses são doenças cosmopolitas com ampla distribuição global e elevada importância na saúde pública, principalmente em regiões pobres. Apresentam características clínicas diversas e multifacetadas e a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica as Leishmanioses em três formas clínicas principais: a Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Visceral (LV) esta última, forma mais grave da doença, pode atingir taxas de mortalidade em torno de 95% dos casos não tratados. Na condição de doença considerada negligenciada, é endêmica em 83 países, resultando na estimativa de mais de 30.000 novos casos anuais de LV ao redor do mundo (WHO, 2018).

É importante ressaltar que o desenvolvimento da doença em vertebrados, incluindo humanos, se relaciona não somente à presença do parasito, mas também a fatores como presença do vetor, visto que a transmissão se dá a partir do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneo infectadas (CLABORN, 2010). Também deve ser considerado o estado imunológico, nutricionais, variações genéticas, ambientais e sociais relacionadas ao hospedeiro (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; THOMAS et al., 2018).

Assim, tendo em vista que o desenvolvimento da história natural da LV é dependente de um conjunto de fatores, as variações no curso clínico da doença podem ocorrer de forma multifacetada, como em casos onde de LV humana pode se apresentar de forma assintomática por períodos que variam de meses até anos, seguindo com o desenvolvimento de uma doença ativa onde ocorre o surgimento dos primeiros sintomas que podem ser mais rápidos na forma aguda ou mais lentos e insidiosos nas formas crônicas ou clássicas. Estes são caracterizados por períodos irregulares de febre, leucopenia, anemia e hepatoesplenomegalia além de emagrecimento, prostração, apatia, seguido de trombocitopenia, perda da função renal, pancreática e hepática até atingir um quadro de disfunção renal e falência múltipla dos órgãos quando não diagnosticados e tratados pode evoluir para o óbito (READY, 2014).

Dentre as aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* com capacidade de infectar mamíferos duas, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, se apresentam como os agentes etiológicos da LV em todo o mundo (READY, 2014; WHO, 2018).

Além disso podem ser evidenciadas diferenças quanto a distribuição geográfica dessas espécies, a *L. donovani*, com característica antroponótica, é prevalente em regiões da África central, sul da Ásia, Índia, China e Oriente médio, enquanto *L. infantum*, com característica zoonótica, se distribui por regiões que vão desde norte da África e Europa até o continente Americano, com atenção a países da América do Sul como o Brasil, responsável por mais de 2500 dos 2603 casos de LV notificados nas Américas em 2019 (95,04%) (READY, 2014; STEVERDING, 2017; PAHO, 2020).

Em vista disso, deve-se atentar a importância da participação do Brasil no elevado número de casos humanos de LV nas Américas, evidenciando assim a necessidade de um controle sustentado e contínuo da doença no país acompanhado de uma forte vigilância epidemiológica permanente (COURA-VITAL et al., 2014).

1.2 Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

O Brasil apresenta, se considerados os números de casos humanos de LV, grande relevância continental, mas não somente os casos humanos devem ser considerados, é necessário ressaltar a presença impactante da leishmaniose visceral canina (LVC), doença zoonótica que possui como agente causador, a *L. infantum* e o cão como o principal reservatório do agente etiológico da doença, seja no ambiente doméstico rural como urbano (DANTAS-TORRES, 2007).

Em se tratando dos hospedeiros, o cão cumpre seu papel de reservatório primário, no entanto outros mamíferos como gambás e mais recentemente o gato doméstico e até mesmo o homem apresentam altos índices de infectividade para o vetor (Kaye & Scott, 2011; QUINNELL & COURTENAY, 2009). Não obstante o cão é considerado hospedeiro e reservatório de maior relevância no ciclo epidemiológico, devido a elevada infectividade, alta carga parasitária cutânea, preferência alimentar do vetor e antropicidade (Dantas-Torres, 2007). Desta forma, estes animais são alvo das medidas de controle do PCLV do Ministério da Saúde que preconiza a identificação e eliminação de cães soropositivo. Assim, reforçando a necessidade de técnicas sorológicas mais sensíveis e específicas capazes de identificar precocemente a positividade, quanto a infecção, de cães residentes, em especial, de áreas de elevada prevalência (DANTAS-TORRES, 2009; COURA-VITAL et al., 2014).

Quanto a manifestação clínica, a LVC é classificada como uma doença sistêmica e essencialmente de curso crônico, que apresenta sinais clínicos, que podem variar desde de

alterações cutâneas como dermatites, onicogrifose, hiperqueratose até alterações sistêmicas como: emagrecimento, apatia, anemia, leucopenia além de distúrbios gastrointestinais, hepáticos, com diversas alterações bioquímicas e hematológicas incluindo acometimentos neurológicos (PALTRINIERI et al., 2010).

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil, cães podem ser classificados em três categorias: casos caninos suspeitos, que apresentam sinais clínicos compatíveis com LVC e são provenientes de áreas endêmicas ou áreas de surto; caso confirmado por critério laboratorial, onde o cão apresenta positividade em teste sorológico/parasitológico ou por critério clínico-epidemiológico, onde o cão é residente de área endêmica ou de surto e apresenta sintomatologia compatível com LVC; e cães infectados, que não apresentam sinais característicos da doença porém possuem resultados parasitológicos e/ou sorológicos positivos em área com transmissão confirmada (BRASIL, 2019).

1.3 Diagnóstico clínico e laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Dentre os métodos para o diagnóstico da LVC, no Brasil, destacamos aqui os que são apresentados no Guia de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2019): (i) diagnóstico clínico baseado na identificação de sinais característicos da doença, que incluem alterações como: alopecias ou dermatites localizadas ou generalizadas, perda de peso/emagrecimento moderada ou grave podendo caracterizar caquequicia, linfadenomegalia, atrofia muscular, poliúria, polidipsia, lesões oculares, onicogrifose entre outros (CIARAMELLA et al., 1997; SOLANO-GALLEGO et al., 2009, REIS et al., 2009). Ainda assim, deve-se atentar ao fato de que sinais clínicos considerados característicos da LVC aparecem também em outras patologias, tornando a avaliação unicamente clínica passível de erro ou confundimento diagnóstico, super ou sub estimando a positividade do animal quanto a condição de doente (SOLANO-GALLEGO et al., 2017).

A fim de classificar de forma mais assertiva cães positivos ou negativos para LVC, métodos que não se baseiam somente nas características clínicas são utilizados, tornando o diagnóstico mais confiável se comparado unicamente a avaliação dessas características clínicas (CHAGAS et al., 2021). Nesse sentido, o (ii) diagnóstico laboratorial, tais como o diagnóstico parasitológico é considerado até hoje como a metodologia padrão ouro, visto sua objetividade, e a capacidade detectar o parasito de forma direta a partir da amostra biológica, seguida de pesquisa exaustiva por microscopia ótica, com conseqüente diminuição da possibilidade de

resultados falso negativos. No entanto ainda estão presentes variáveis que podem ser consideradas problemáticas como: coleta da amostra, habilidades técnicas do laboratorista, qualidade do material entre outros que levam a uma baixa sensibilidade, geralmente associado a forma clínica da LVC (REIS et al., 2006-2009; MOREIRA et al., 2007; DE BRITO et al., 2020a).

Ferramentas moleculares também compõe os possíveis métodos de diagnóstico que podem ser aplicados à LVC, sendo a cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) exemplo notável dessas ferramentas quem vem demonstrando elevada especificidade e sensibilidade além do potencial prognóstico de prever a caga parasitária tecidual em especial na pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (DE CARVALHO et al., 2018). Os métodos moleculares se baseiam na análise do possível material genético do parasito presente em diferentes amostras biológicas obtidas de biopsias que podem ser coletadas em diferentes tecidos do animal e usam estas para extração de DNA e a amplificação de fragmentos específicos de determinadas regiões do genoma, como o kDNA, até o sequenciamento genético para discriminação entre diferentes espécies (SUNDAR; SINGH, 2018).

Ainda quanto aos métodos moleculares devem ser considerados fatores, como a possibilidade de detecção de fragmentos genéticos de parasitos mortos quando a amplificação é baseada em fragmentos de DNA (LASKAY et al., 1995). Observa-se também diferenças quanto a especificidade e sensibilidade, entre os tecidos utilizados como amostras o que influencia, por exemplo, no monitoramento de estado do parasitismo canino por *L. infantum* (SUNDAR; SINGH, 2018; CHAGAS et al., 2021).

Logo, somos confrontados com várias opções de testes de diagnóstico laboratorial, com diferentes vantagens e desvantagens e que podem ser empregados no diagnóstico da LVC, o que reflete na continua busca por maior sensibilidade, especificidade e praticidade de execução, com a intenção de evitar diagnósticos falso positivos ou negativos, principalmente em animais assintomáticos (PESSOA-E-SILVA et al., 2019; DE BRITO et al., 2020a).

1.3.1 Diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A busca por aprimorar o diagnóstico da LVC, no entanto, não deve relevar características que garantam sua praticidade. Assim os testes sorológicos, por suas características de praticidade e seu potencial de evolução, se mostram como importante vertente de estudos pois são amplamente empregados em diferentes partes do mundo como uma

ferramenta de rastreamento soroepidemiológico e auxiliam muito na detecção e remoção de cães soropositivos em áreas endêmicas (DUTHIE; LISON; COURTENAY, 2018; DE BRITO et al., 2020a). Tais técnicas se espelham em reações imunológicas que ocorrem no organismo do hospedeiro e remontam à características de reconhecimento e eliminação de patógenos, onde certas proteínas do soro sanguíneo reconhecem de macromoléculas ou microrganismos por meio de porções ou fragmentos, denominados epítomos (CLARK; LISTER; BAR-JOSEPH, 1986). Sabe-se ainda que moléculas de anticorpos são providas intrinsecamente de especificidade, esta, necessária para o reconhecimento de antígenos. Os mecanismos adotados no reconhecimento e especialização dos anticorpos levam a explorar horizontes aos quais os testes imunodiagnósticos estão presentes (SELA-CULANG; KUNIK; OFRAN, 2013).

Na LVC, testes sorológicos usam desses mecanismos, assim sendo, panoramas epidemiológicos devem ser estruturados para correta abordagem da técnica, principalmente em áreas endêmicas para a doença, onde a necessidade é majoritária para testes com alta sensibilidade. No entanto, existe a possibilidade de reatividade cruzada caso o indivíduo seja infectado por outros patógenos que apresentem ou compartilham de epítomos semelhantes quanto ao seu reconhecimento pelo anticorpo (BANETH; AROCH, 2008).

Dentre os testes utilizados para o diagnóstico imunológico podem ser citados o Teste de Aglutinação Direta (DAT), Teste Imunoenzimático (ELISA), a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), e teste imunocromatográfico rápido (DPP®). Alguns destes testes possuem baixa, média ou mesmo alta complexidade de execução, dependendo de equipamentos, automação, pessoal técnico capacitado e reagentes biotecnológicos. O DAT, por exemplo, vem sendo utilizado desde a década de 80, se tornou atrativo visto que não necessita de estrutura demasiadamente elaborada, assim como não despende de grandes recursos para a sua realização. No entanto alguns fatores como tempo para realização do teste e necessidade de diluições seriadas do soro se apresentam como limitadores (GARCEZ; SHAW; SILVEIRA, 1996; HAILU, 2002; SILVA et al., 2005).

Já as outras técnicas, também utilizadas no Brasil e recomendadas pelo Ministério da Saúde, consistiam, até 2012, na associação das técnicas de ELISA e RIFI, no processo de triagem soroepidemiológica para fins de controle e profilaxia ou mesmo para confirmação de animais suspeitos, respectivamente. A etapa de triagem, utilizando a ELISA, que remonta aos anos de 1970 do século passado, consiste na adsorção de antígenos ou subunidades de antígenos purificados de *Leishmania* derivados de cultura *in vitro* em microplacas, que posteriormente são expostas a soro de animais que viriam a ser testados, animais que apresentassem resultados

positivos no ELISA, deveriam ser confirmados também pela técnica de RIFI. A RIFI, por sua vez, utiliza de formas promastigotas fixadas de *Leishmania sp.* que interagem com os anticorpos do soro e a reação é revelada através de um anti-anticorpo ou conjugado, estes por sua vez ligado a uma molécula fluorescente, geralmente o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (HOMMEL et al., 1978; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No entanto, devido a possibilidade de resultados falso positivos na RIFI e sua baixa sensibilidade esta metodologia foi sendo aos poucos substituída e deu lugar a uma técnica imunocromatográfica, que emprega antígeno recombinantes denominada DPP[®], técnica esta que passou a ser utilizada como metodologia de triagem, permanecendo a ELISA como método recomendado para o diagnóstico, mas desta vez para a fase de confirmação da positividade quanto a LVC (COURA-VITAL et al., 2014; BRASIL, 2019).

Assim, atualmente, de acordo com o Guia de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL 2019), a metodologia utilizada no diagnóstico individual ou avaliação de prevalência durante inquéritos amostrais ou censitários é composta pelos testes rápido (DPP[®]) e pela técnica imunoenzimática (ELISA). Essas duas técnicas são utilizadas para triagem e confirmação, respectivamente de animais suspeitos, no entanto, como é mostrado em alguns estudos a sensibilidade que varia de 78 - 72% no teste rápido e a especificidade que pode variar de 60,4 – 97,8% em ELISA. O baixo desempenho da técnicas de escolha, vem comprometendo a utilização desses testes como critérios de diagnóstico em programas de controle da LVC, principalmente em animais assintomáticos, uma vez que o resultado positivo define a remoção e eutanásia dos cães e o resultado negativo pode não significar ausência de infecção (LIRA et al., 2006; FRAGA et al., 2016).

Nesse contexto, o uso de peptídeos sintéticos, que remonta a década de 80, adquiriu sua devida importância visto sua versatilidade, capacidade de produção em larga escala e potencial incremento na especificidade e sensibilidade quando aplicados em testes de ELISA por exemplo (GEYSEN; MELOEN; BARTELING, 1984). Considerando as vantagens da utilização dessas moléculas sintéticas, trabalhos vêm sendo desenvolvidos empregando proteínas recombinantes, quimeras ou mesmo peptídeos sintéticos para o diagnóstico da LVC. Exemplo disso pode ser visto no trabalho de Faria e colaboradores em 2011, que fizeram uso de peptídeos sintéticos no diagnóstico da LVC, onde pôde ser notada uma melhora na sensibilidade (84,1%) em um dos peptídeos selecionados, valor interessante levando em conta a necessidade de alta sensibilidade em testes de triagem (FARIA et al., 2011). Sensibilidade superior a 80% também foi observada por Costa et al., (2012) que obtiveram alta especificidade e sensibilidade que variou de 82 a

96% e 81 a 94% respectivamente, utilizando peptídeos em amostras de soro de cães tanto assintomáticos quanto sintomáticos (LIU et al., 2014). Sendo assim, o potencial já apresentado na utilização de peptídeos como componentes de testes diagnósticos abre caminhos para estudos que busquem melhorar ou elaborar testes imunodiagnóstico para doenças parasitárias como é o caso da LVC (NOYA et al., 2003).

1.4 O emprego da Bioinformática (Imunoinformática) na predição de alvos de antígenos para diagnóstico

O aumento da capacidade de se obter informações biológicas relevantes através do sequenciamento genômico de patógenos, levou ao consequente aumento no número de dados, em grande parte, devido as evoluções no campo da biologia molecular. Tal volume resultou também na interdisciplinaridade envolvendo matemática, estatística, ciências da computação e biologia como forma de analisar o enorme número de variáveis que continuava a crescer a medida em que novas moléculas, interações e mecanismos eram descobertos, dando origem a bioinformática (BALDI; BRUNAK; BACH, 2001).

A bioinformática impactou, então, diretamente em pesquisas relacionadas a medicina, facilitando desde a análise até a interpretação de dados obtidos a partir de sequencias de aminoácidos, estruturas de proteínas e suas interações (PAL; BANDYOPADHYAY; RAY, 2006).

Esse grande volume de dados biológicos também era adquirido na busca por componentes imunogênicos e antigênicos potenciais para serem empregados em testes diagnósticos, que quando baseados em ensaios imunológicos, torna estes novos alvos de antígenos peças chave na ampliação da confiabilidade dos resultados gerados. Sendo assim, a busca por antígenos que melhorem o desempenho diagnóstico desses testes tornou-se uma área de fronteira na ciência que vem gerando novas perspectivas diagnósticas, seja nas doenças infecciosas ou mesmo em doenças crônicas degenerativas oferecendo assim, novos biomarcadores de diagnóstico e/ou de prognóstico e monitoramento de doenças. Conjuntamente aos avanços da bioinformática e a busca por melhores testes diagnósticos, houve produção de forma, relativamente mais simples e consequentemente em maior escala, de potenciais antígenos e biomarcadores antigênicos que poderiam ser usados em imunoensaios, dentre estes destacam-se os peptídeos sintéticos (BODANSZKY, 1985; NOYA et al., 2005; FARIA et al., 2011).

Estudos envolvendo a bioinformática na busca por peptídeos imunogênicos de interesse médico já mostraram seu elevado valor. Exemplo disso pode ser visto no potencial de vacinas contra LVC, quando De Brito et al em 2019, com metodologia denominada de vacinologia reversa, conseguiram mostrar que peptídeos sintéticos, selecionados com auxílio de imunoinformática, são capazes de levar a estimulação de sistema imune celular e humoral além de elevada redução na carga parasitária em camundongos imunizados com estes peptídeos e desafiados com *L. infantum* (DE BRITO et al., 2019). A cada dia, estudos vem evidenciando o horizonte vasto e promissor da utilização das técnicas de bioinformática na busca por moléculas de interesse médico (BRANCO; CHOUPINA, 2021).

1.4.1 Seleção de epítomos de células B

Epítomos de células B, também conhecidos como determinantes antigênicos, são porções específicas de antígenos, que podem, ao entrar em contato com um anticorpo, levar a estimulação clonal destas células B amplificando a resposta imune humoral. Tais epítomos podem ser categorizados como contínuos, cuja sequência local abriga os resíduos, ou descontínuos, onde os resíduos podem ser resultados da aproximação de diferentes regiões da sequência de polipeptídios uma das outras (BARLOW; EDWARDS; THORNTON, 1986; KRINGELUM et al., 2013). Algoritmos computacionais que auxiliam no mapeamento, seleção e consequente identificação desse epítomos ganham espaço, tendo em vista a possibilidade da utilização dessas pequenas porções de aminoácidos no desenvolvimento de vacinas ou testes diagnósticos (NOYA et al., 2003; BRITO et al., 2017).

Considerando as possibilidades do uso desses epítomos, a identificação dos mesmos em sequências proteicas pode ser feita com o auxílio de diferentes ferramentas computacionais que a bioinformática oferece. Os métodos de seleção podem incluir parâmetros como antigenicidade, hidrofobicidade, flexibilidade, dentre outros (KARPLUS; SCHULZ, 1985; PARKER; GUO; HODGES, 1986; KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990). No entanto a utilização de somente um parâmetro físico-químico para seleção de epítomos já mostrou não garantir bons resultados (BLYTHE; FLOWER, 2009).

Com objetivo de obter melhores resultados na seleção dessas sequências e aumentar a acurácia da predição *in silico*, métodos tanto para a predição de epítomos lineares como para epítomos conformacionais podem utilizar da aprendizagem de máquinas, que se baseia em algoritmos formulados a partir de resultados esperados, criando suas regras durante o processo

de obtenção dos dados (MUNTEANU et al., 2019). Pode-se então considerar que a combinação de mais de um método para predição de epítomos de células B apresenta vantagens. Um exemplo disso pode ser observado em algoritmos preditivos de células B como BepiPred e ABCpred, onde o primeiro utiliza de modelo oculto de Markov combinado a escala de propensão e o segundo utiliza a aprendizagem de máquinas, no intuito de aumentar a acurácia das predições de epítomos de células B (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006; SAHA; RAGHAVA, 2006).

Um das aplicações dos algoritmos para a predição de epítomos de células B pode ser observado no trabalho realizado em 2014 por Brito e colaboradores (Brito et al., 2014), Estes autores elaboraram um banco de dados relacional para epítomos para células B e células T a partir do proteoma predito de *L. infantum*. Durante o trabalho, foram detectadas 8.241 proteínas de *L. infantum*, as quais foram submetidas, em se tratando de predição de células B, aos algoritmos BepiPred, AAP12 e BCPred12, além de avaliação de localização subcelular. Após isso, os resultados obtidos, assim como as sequências foram depositados no banco de dados utilizando o sistema de gerenciamento MySQL (BRITO et al., 2017). Tal banco de dados foi utilizado posteriormente para a prospecção dos peptídeos empregados no presente estudo.

1.4.2 Predição de estruturas proteicas

Partindo do pressuposto de que a estrutura das proteínas está intimamente ligada com sua função, determinar sua conformação é parte importante do processo para compreensão de sistemas biológicos complexos. Nesse sentido, a bioinformática por meio da possibilidade de predição da estrutura tridimensional de moléculas, permitiu a compreensão de interações em complexos receptor-ligante, e passou a contribuir diretamente em diversos estudos relacionados à área médica em especial na saúde pública (COHEN, 1996; ORENGO; TODD; THORNTON, 1999).

As ferramentas que permitem realizar a predição dessas estruturas estão em constante evolução e uma das alternativas para predição de estruturas tridimensionais se baseia no uso modelos já validados e pertencentes a bancos de dados na maioria das vezes com acesso aberto, como o *Protein Data Bank* (PDB). Esse tipo de modelagem como o método sugere é denominada de modelagem baseada em modelos, onde considera-se o alinhamento entre a sequência alvo e um molde a fim de gerar a estrutura final (KUHLMAN; BRADLEY, 2019).

Quanto as estratégias para predição estrutural DORN et al. (2014) considerou 4 classes: métodos de primeiros princípios com informação de banco de dados, métodos de primeiros

princípios sem informação de banco de dados, métodos de modelagem comparativa e alinhamento de sequências e métodos de reconhecimento de dobra (*Fold Recognition*) e encaixe (*Threading*).

Nesse contexto pode-se destacar o método de *Fold Recognition* e *Threading*, o qual é baseado na avaliação de encaixe ideal entre a sequência e um ou mais modelos, que são obtidos a partir de banco de dados conhecidos, seguido da identificação de padrões de substituição (DORN et al., 2014). Essa metodologia se baseia na maior conservação evolutiva das estruturas se comparadas a sequência, o que leva a crer na finidade de conformações das estruturas com consequente possibilidade de obter moldes apropriados visto a quantidade de conformações já estabelecidas em bancos de dados (MARSDEN, 2006).

A fim de facilitar a utilização dessa metodologia, servidores como o RaptorX dispõem de uma interface convidativa que permite a geração de estruturas que podem vir a ser utilizadas em análises posteriores, disponibilizando informações essenciais para procedimentos como identificação de sítios de ligação entre receptor e ligante (ZHAO; YANG; ZHOU, 2011; KÄLLBERG et al., 2012). Ainda assim deve-se atentar a possibilidade de produção de modelos incorretos, o que pode acarretar em insucesso das análises posteriores (SIPPL, 1993).

A fim de minimizar essa possibilidade, métodos de refinamento e posterior validação são utilizados com objetivo de melhorar e avaliar a qualidade da conformação do modelo tridimensional gerado, exemplos de ferramentas que possibilitam esse refinamento e validação são o GalaxyWEB server (KO et al., 2012) e o ProSA-Web (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) respectivamente.

1.4.3 Ancoragem molecular

Com o desenvolvimento da bioinformática cresceram as possibilidades de observação e análise da interação entre moléculas. Metodologias que abordam essas possibilidades são conhecidas como ancoragem ou *docking* molecular, tais metodologias permitiram realizar a ancoragem entre diferentes moléculas, como proteínas e peptídeos (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017).

O baixo custo somado a racionalização no processo de descoberta de novas moléculas de interesse médico faz da ancoragem molecular uma boa opção quando se necessita avaliar a interação de um dado ligante ao um receptor ou comparar diferentes ligantes (BRUZZONI-GIOVANELLI et al., 2018). No entanto deve-se atentar ao método de atracagem a ser utilizado,

visto a pluralidade de categorias que compreendem, o que pode ser observado na divisão dos métodos de atracagem em três categorias: atracagem baseada em modelo, atracagem local e atracagem global (CIEMNY et al., 2018).

Para a atracagem baseada em modelo é recomendado que exista semelhança entre o molde e o complexo estudado, conseqüentemente é importante o conhecimento prévio das moléculas que participam da atracagem. No entanto, a ausência de um modelo já estabelecido que possa servir como molde limita o uso desse método (KUNDROTAS et al., 2012). Ainda assim, pode-se encontrar servidores *online* que buscam automaticamente, considerando a similaridade com as estruturas fornecidas pelo usuário, por moldes já caracterizados e depositados em bancos de dados, como exemplo, o GalaxyPepDock (LEE et al., 2015).

Já os métodos de atracagem local buscam pela conformação do peptídeo ligante a partir de informações prévias disponibilizadas, além de, se necessária, a preparação prévia da estrutura inicial pelo usuário (ALAM; SCHUELER-FURMAN, 2017). Alguns métodos como o Rosetta FlexPepDock *ab-initio*, no entanto, possibilitam a realização da atracagem entre proteína e peptídeo considerando o segundo como estrutura de alta flexibilidade o que diminui a necessidade dessas informações prévias quanto a conformação do peptídeo (RAVEH et al., 2011).

A terceira categoria, atracagem global, conta com a possibilidade de encontrar o sitio de ligação além da conformação do peptídeo. Esses métodos de atracagem global podem trazer ao usuário maior conforto, visto a facilidade e rapidez disponibilizados pela interface e quantidade de informação necessária para realização da metodologia. O CABSdock é um exemplo que conta com a interessante característica de considerar as estruturas, proteína e peptídeo, como flexíveis refletindo na maior similaridade com a interação nativa (KURCINSKI et al., 2015).

1.4.4 Dinâmica molecular

Estruturas proteicas ou complexos proteicos apresentam particularidades não só quanto sua estrutura, mas também quanto ao seu comportamento em determinado meio. Assim, pode-se inferir a possibilidade de que a composição do meio no qual a proteína se encontra pode interferir na função biológica, em parte devido a mudanças conformacionais da proteína (MURPHY, 2001). Em vista disso e da evolução da bioinformática, tornou-se possível obter dados sobre eventos relacionados a movimentação estrutural e interações entre moléculas, nesse sentido a dinâmica molecular (DM) desempenha papel fundamental remontando a década

de 70, onde já se avaliava determinadas moléculas quanto suas flutuações estruturais (MCCAMMON; GELIN; KARPLUS, 1977).

A democratização do emprego da DM se justificou então, por prover detalhes estruturais de moléculas em função do tempo, considerando ação de forças resultantes da interação entre um meio e uma molécula em um determinado sistema. No entanto, alguns entraves são notados quanto a esse método, como a necessidade de computadores com capacidade de processamento extremamente robustos para análises de maior duração ou de complexos com maior nível de elaboração (SHAW et al., 2008).

A fim de contornar tais problemas os algoritmos usados nas simulações se refinam progressivamente permitindo, que o trabalho seja feito de maneira cooperativa, o que em parte pode parecer uma dificuldade mas pode levar ao intercâmbio de informações essenciais para o resultado final de pesquisas (PÁLL et al., 2015). No entanto, mesmo apresentando alguns pontos considerados negativos, por meio de plataformas que não exigem quantidades elevadas de especialização por parte do executor ou robustez tecnológica da máquina empregada, algumas metodologias resultam em bons resultados, permitindo a análise de estruturas quanto as suas mudanças conformacionais em determinados sistemas biológicos (LEMKUL, 2019).

Exemplo disso é visto com a utilização do GROMACS, uma alternativa gratuita quando se tratando de simulações de dinâmica molecular, contando com um pacote que permite, por meio de equações newtonianas, a análise de sistemas biomoleculares com a combinação de GPU-CPU diminuindo o tempo para execução da simulação, em sistemas não tão extravagantes, da necessidade de super computadores para realizar tais simulações (PÁLL et al., 2015).

Em suma, não somente a DM, mas as técnicas de bioinformática incluindo as citadas nos tópicos anteriores, se apresentam como ferramentas para identificação de novos antígenos que podem vir a ser utilizados em métodos sorológicos.

Assim, a partir do banco de dados relacional, elaborado previamente por Brito, (2014), o presente trabalho buscou identificar epítomos de *L. infantum* com potencial para serem reconhecidos por células B. Ferramentas de bioinformática como: algoritmos para alinhamento de sequência, redes de interação proteína-proteína, BLASTp, atracagem e dinâmica molecular foram utilizados então, como complemento para a seleção desses epítomos. Em vista disso, o presente trabalho busca fortalecer o potencial do uso de ferramentas de bioinformática na seleção de peptídeos com potencial para o emprego em testes diagnósticos da LVC.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Selecionar peptídeos com alto potencial para uso em testes imunodiagnósticos a partir de um banco de dados relacional.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os complexos formados entre peptídeos e cadeia pesada gama da imunoglobulina de *Canis familiares*;
- Avaliar complexos formados na atracagem molecular;
- Avaliar o potencial dos peptídeos identificados para o diagnóstico da LVC por meio de prova de conceito por reação imunoenzimática ELISA para certificar o potencial destes peptídeos no diagnóstico da LVC;
- Avaliar a capacidade da técnica em diferenciar cão saudáveis de cães infectados por *L. infantum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento metodológico

A realização deste trabalho seguiu o delineamento de acordo com o apresentado no fluxograma da figura 1. O início do trabalho se deu a partir da busca no banco de dados relacional proposto por Brito et al., 2014, dos peptídeos que cumpriram critérios como ter maiores escores quanto aos algoritmos de predição de células B e não pertencerem a regiões intracelulares. Em seguida as proteínas as quais continham os epítomos selecionadas foram submetidas a avaliação de similaridade com organismos humano, camundongo e cão a fim de evitar interação entre estes organismos e os peptídeos selecionados, com posterior avaliação de sua importância em funções biológicas por meio de rede de interação proteína-proteína. Os peptídeos então foram avaliados quanto à similaridade a outros patógenos. Consequente os peptídeos foram avaliados quanto sua interação e estabilidade quando em complexo com a cadeia pesada gama da imunoglobulina de cão por meio de atracagem e dinâmica molecular. Ao final foi então realizada padronização e a prova de conceito, utilizando do método imunoenzimático ELISA.

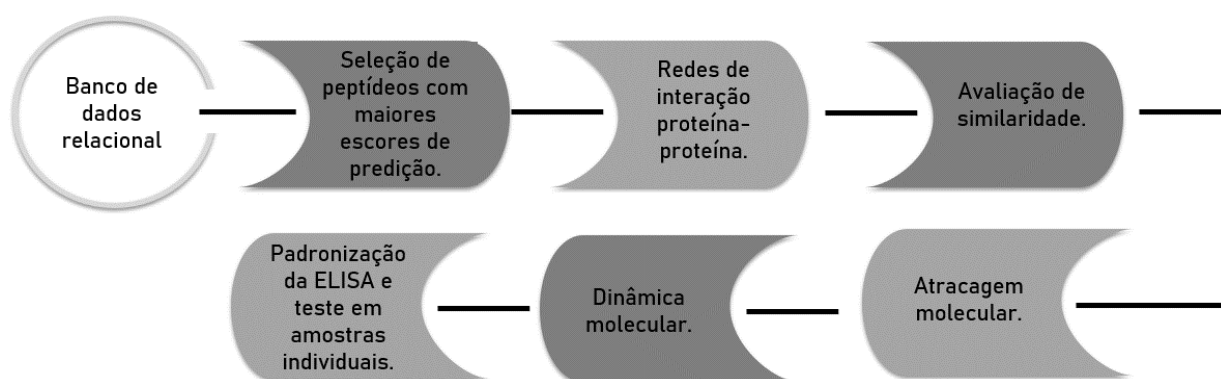


Figura 1-Fluxograma do delineamento metodológico sintetizando as etapas realizadas durante o estudo.

Todas as ferramentas utilizadas na etapa *in silico* são gratuitas. Além disso, com exceção do programa GROMACS, todas pertencem a servidores online. A utilização de cada ferramenta, assim como seu endereço para acesso podem ser observados da tabela 1.

Tabela 1- Lista de ferramentas utilizadas nas etapas *in silico* durante o estudo.

UTILIZAÇÃO	FERRAMENTA	ENDEREÇO
Predição de Epítomos de células B	AAP12	http://ailab-projects1.ist.psu.edu:8080/bcpred/predict.html
	BCPred12	
	Bepipred	http://ailab-projects1.ist.psu.edu:8080/bcpred/predict.html#dtu.dk
Predição de localização celular	WoLF PSORT	https://wolfsort.hgc.jp/
	Sigcleave	EMBOSS: sigcleave (bioinformatics.nl)
	TargetP	TargetP-2.0 (dtu.dk)
	TMHMM	TMHMM Server, v. 2.0 (dtu.dk)
Avaliação de interação entre proteínas	STRING	https://string-db.org/
Avaliação de similaridade de sequências	BLASTp	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
Tradução de sequência	Expasy	ExPASy - Translate tool
Predição e refinamento de estrutura tridimensional	RaptorX	RaptorX - Contact: a protein contact map and distance matrix prediction server (uchicago.edu)
	GalaxyWEB	GalaxyWEB (seoklab.org)
Validação de estruturas Tridimensionais	ProSA-web	https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php
	RAMPAGE	http://mordred.bioc.cam.ac.uk/rapper/~rampage.php
Atracagem Molecular	CABS-dock	CABS-dock: server for protein-peptide docking (uw.edu.pl)
Dinâmica Molecular	GROMACS	GROMACS - Gromacs

3.2 Busca no banco de dados relacional

O banco de dados consultado foi elaborado de acordo com o proposto por RESENDE et al., em 2012, que evidenciava a vantagem no uso de mais de um algoritmo para a predição de epítomos de células B, especialmente quando se tratando de protozoários (RESENDE et al., 2012). Em vista disso BRITO et al. (2014) construíram, a partir do proteoma total de *L. infantum*, um banco de dados relacional baseado em MySQL com as informações obtidas, se consideradas as predições para células B, pelos algoritmos, AAP12, BCPred12 e BepiPred (CHEN et al., 2007; LARSEN et al., 2007; EL-MANZALAWY; DOBBS; HONAVAR, 2008). Os resultados obtidos por esses algoritmos foram depositados juntamente com informações sobre a localização subcelular, que foram resultado da utilização dos algoritmos WoLF PSORT, Sigcleave e TargetP (VON HEIJNE, 1986; EMANUELSSON et al., 2000; HORTON et al., 2007). Assim, por meio desse banco de dados foi possível cruzar informações dos resultados obtidos a partir de cada algoritmo, utilizando de *scripts* MySQL.

Para tal, o *script* de busca foi elaborado de modo que o ponto de corte para cada algoritmo fosse mais restritivo com gradual diminuição desse valor até um score livre. Foram utilizados como scores iniciais, considerados altos, de 1 para os dois primeiros algoritmos

(APP12 BCPred12) e 1,5 para o BepiPred. Durante essa seleção, os peptídeos deveriam também cumprir como requisito não estar localizados em regiões de intracelulares do parasito ou serem secretados ou excretados por estes. Após a busca no banco de dados, foi utilizado o algoritmo TMHMM (KROGH et al., 2001) a fim de descartar peptídeos que pertencessem a regiões intracitoplasmáticas e transmembrana, selecionando assim somente porções de proteínas localizadas em regiões extra citoplasmáticas.

3.3 Elaboração da rede de interação proteína-proteína

Com intenção de elucidar as interações e vias metabólicas das proteínas que continham os peptídeos selecionados na etapa anterior foi utilizado o algoritmo STRING v.11 (SZKLARCZYK et al., 2015) onde estabeleceu-se a *Leishmania* como organismo de referência. Prospecção de texto, experimentos, banco de dados, co-expressão, vizinhança, fusão genética e co-ocorrência foram utilizados como fontes ativas de interação.

Para a construção das redes de interação proteína-proteína (PPI) os pontos centrais foram definidos como a proteína alvo, que se expandem até os primeiros vizinhos, com o valor máximo de 500 interações. A utilização do algoritmo STRING permitiu obter dados sobre as redes de PPI e banco de dados KEGG (KANEHISA, 2016) e sobre as vias funcionais de enriquecimento ($p < 0,05$) das proteínas envolvidas nessas redes. O desenho das redes de proteínas foi feito com auxílio do programa Cytoscape (SHANNON et al., 2003) com adição das informações obtidas do KEGG.

3.4 Avaliação de similaridade

Em seguida, foi avaliada a especificidade dos peptídeos selecionados quando confrontados a proteínas preditas do proteoma de outros parasitas: *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia sp.* e *Babesia sp.* Para tal o algoritmo BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado.

Posteriormente este mesmo algoritmo foi novamente utilizado a fim de eliminar proteínas que, mesmo cumprindo os critérios anteriores, apresentavam similaridade maior que 60% a humano, cão e camundongo diminuindo assim a possibilidade de obter proteínas já presentes nesses três organismos (HERRERA-NAJERA et al., 2009).

3.5 Modelagem molecular da cadeia pesada gama do anticorpo IgG de cão

Considerando a ausência de estrutura tridimensional de anticorpo IgG canino isolado no banco de dados de proteínas (PDB) e com a intenção de mostrar a interação entre os peptídeos selecionados e uma molécula biológica, seguiu-se para modelagem da cadeia pesada gama da imunoglobulina de *canis lupus familiaris* a partir de RNA mensageiro (mRNA) depositado no Sistema de Informação Imunogenética Internacional (IMGT)[®] (TANG et al., 2001; GIUDICELLI et al., 2006).

A partir do número de acesso AF354264, a sequência contendo 1.654 pares de bases da cadeia pesada gama da imunoglobulina de cão foi obtida e traduzida para sequência proteica utilizando o algoritmo ExpPASy (GASTEIGER et al., 2003), conjunto de ferramentas para análises de proteínas e proteômica, que inclui ferramenta de tradução de sequências de nucleotídeos para sequências proteicas.

Consequente, a sequência proteica que resultou da tradução foi submetida a modelagem de sua estrutura tridimensional utilizando o RaptorX (PENG; XU, 2011), que é um servidor baseado em interfaces neurais a fim de obter o alinhamento entre sequência e estrutura molde, o modelo final gerado pelo RaptorX é resultante da modelagem comparativa, utilizando da similaridade entre modelos a fim de diminuir os erros de alinhamento (PENG; XU, 2011; KÄLLBERG et al., 2012).

Com intenção de refinar o modelo tridimensional obtido na etapa anterior foi utilizado o servidor online GalaxyWEB (KO et al., 2012), que a partir do modelo tridimensional disponibilizado inicialmente, submete a estrutura a consecutivas perturbações e relaxamento estrutural a fim de buscar a otimização energética do modelo.

Seguiu-se então para a validação do modelo refinado, etapa que contou com dois métodos, ProSA-web (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) que avaliou a qualidade geral do modelo considerando a energia total da estrutura depositada e RAMPAGE que avaliou os aminoácidos da estrutura quanto a sua geometria, gerando o diagrama de RAMACHANDRAN que mostrou a proporção dos resíduos em regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis (LOVELL et al., 2003).

3.6 Atracagem molecular

Nessa etapa foi avaliado primeiramente a atracagem entre os peptídeos e a cadeia pesada gama da imunoglobulina IgG de cão, para isso utilizou-se o servidor online CABSdock (KURCINSKI et al., 2015).

A metodologia de escolha se baseia na geração de estruturas aleatórias do peptídeo que são então submetidas a simulação de atracagem por meio de método de Monte Carlo, nesse processo são produzidas trajetórias em função de escala decrescente de temperatura a qual o modelo peptídeo-proteína é submetido. Os modelos finais são então selecionados e 10 deles são reconstruídos e disponibilizados ao usuário. Deve-se atentar ainda ao fato de que este servidor não necessita de conhecimento prévio do local de ligação além de permitir flexibilidade total do peptídeo assim como pequenas flutuações do receptor (KURCINSKI et al., 2015; BLASZCZYK et al., 2016).

Sendo assim a porção modelada do anticorpo foi utilizada em formato PDB seguido da sequência de cada peptídeo em formato FASTA, os modelos finais de cada complexo foram então ranqueados utilizando desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD), gerada juntamente a cada um dos 10 modelos finais, um para cada peptídeo.

3.7 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular foi realizada, para cada um dos 10 modelos obtidos após a atracagem, utilizando o pacote GROMACS versão 5.4.1 (ABRAHAM et al., 2015) e de acordo com tutorial “Lysozyme in Water”(LEMKUL, 2019). Cabe ressaltar que o pacote GROMACS versão 5.4.1 é projetado especialmente para simulações envolvendo moléculas orgânicas foi a única das metodologias *in silico* executadas com servidores locais.

Para a construção do sistema que foi submetido a simulação de DM, o primeiro passo envolveu a criação da topologia dos modelos gerados por atracagem molecular. Para isso foi utilizado o programa pdb2gmx, que gera coordenadas a partir da escolha de um campo de força que, nesse estudo, foi o “OPLS-AA/L all-atom force field”. Após isso foi gerada a topologia contendo todas as informações necessárias para os próximos passos da dinâmica molecular.

Em seguida foi realizada a etapa de solvatação, onde o local de realização da simulação é definido, neste estudo foi utilizado um sistema aquoso simples adicionado de íons por meio da ferramenta genion, também pertencente ao GROMACS, nessa etapa os íons são adicionados ao solvente gerando um sistema eletroneutro. A próxima etapa, a minimização de energia, foi realizada a fim de obter a estrutura inicial do sistema em relação a orientação de solventes e

precedeu o equilíbrio, que evita que o sistema entre em colapso durante a simulação, estabilizando o solvente ao redor da proteína.

Após minimização de energia e equilíbrio do sistema quanto a temperatura e pressão, as restrições de posição foram liberadas e a DM foi então executada. A simulação foi realizada durante 10 ns e os valores de RMSD gerados foram visualizados com o auxílio do programa Gnuplot (WILLIAMS; KELLEY, 1998).

3.8 Seleção de amostras de soro canino para prova de conceito sorológico da avaliação potencial dos peptídeos para o diagnóstico da LVC

Foram selecionadas 20 amostras de soro canino a partir do banco de soros, já caracterizados, do Laboratório de Imunopatologia do NUPEB na Universidade Federal de Ouro Preto. De acordo com a aprovação por meio do comitê de ética da instituição com código 083/2007 (em anexo).

Como controles negativos foram selecionadas 10 amostras de cães saudáveis não infectados (CNI), nascidos e criados no canil do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP, Minas Gerais, Brasil). As amostras foram avaliadas em estudo anterior quanto sua negatividade em teste parasitológico por isolamento do parasito em medula óssea, seguida da caracterização da espécie por Reação de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos (RFLP) conforme descrito por Volpini et al 2004, teste rápido DPP e ensaio imunoenzimático ELISA. As amostras de soro de cães infectados (CI) por *L. infantum* foram selecionadas a partir da positividade nas mesmas técnicas citadas anteriormente.

3.9 Síntese dos peptídeos

Dez peptídeos lineares de *L. infantum* (15-17 mer) foram sintetizados com pureza superior a 95% obtida através de purificação por cromatografia líquida de alta performance pela empresa americana Genscript LTDA (Piscataway, NJ, USA). Assim que os peptídeos chegaram no Laboratório de Imunopatologia, foram devidamente armazenados em ultra freezer a -80°C até o momento do uso, quando foram ressuspensos (1 mg/mL) em dimetil sulfóxido (DMSO).

3.10 Padronização da técnica de ELISA

A etapa de padronização foi realizada utilizando-se controles positivos de soros de cães infectados (CI) e soros sabidamente de cães não infectados (CNI). De posse destes soros foram preparadas misturas ou *pools* compostos de 3 amostras para cada tipo de controle (negativo e positivo). Utilizando desses *pools* de soros foi realizado primeiramente os testes piloto, onde foram testadas duas concentrações de peptídeo, 0,25 e 0,5 µg para cada 100µL para sensibilização dos poços das placas de ELISA. Além disto, foram também testadas duas diluições de conjugado IgG anti-cão (1:16.000 e 1:20.000) e três diluições das amostras de *pool* de soros controles (1:200, 1:400 e 1:600).

Após isso, buscamos obter as curvas de diluição das amostras de soro e conjugado anti-IgG de cão. Nessa etapa foram testadas diluições de 1:16:000; 1:20:000 e 1:24:000 para o conjugado e a amostra em diluições de 1:200; 1:400 e 1:600.

3.11 Reação imunoenzimática ELISA

Para a reação foram utilizados, de forma individual, soros de 10 animais infectados com *L. infantum* e 10 animais saudáveis. Utilizou-se placas de poliestireno de fundo chato (Nunc MaxiSorp[®]) que foram sensibilizadas com cada peptídeo, na concentração de 0,25µg por poço, cada poço contendo 100µL de tampão carbonato-bicarbonato (pH9.6), após isso foram incubadas a temperatura de 4°C *overnight*. Após incubação foram realizadas 4 lavagens consecutivas com solução de lavagem composta por PBS (pH 7,2) adicionado de 0,05% de Tween 20, a fim de remover o excesso de antígenos. Em seguida utilizando solução de lavagem adicionada de 5% de BSA foi feito bloqueio de possíveis sítios livres, nessa etapa cada poço foi preenchido com 100µL dessa solução de bloqueio por 2 horas a 37°C. Seguiu-se então para outra etapa de 4 lavagens consecutivas e, após isso, as amostras foram adicionadas após diluição em solução de bloqueio (100µL/poço) e novamente incubadas a 37°C, durante 1 hora. Novamente após incubação e 4 lavagens consecutivas as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com IgG anti-cão de ovelha conjugada com peroxidase diluída em solução de lavagem (100µL/poço). As reações foram realizadas utilizando 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina como substrato durante 20 minutos ao abrigo da luz, com posterior interrupção da reação utilizando 30 µL de 2.5M de H₂SO₄, seguido da leitura em espectrofotômetro (ELX800 Biotek Instruments VT, USA) à 450 nm.

3.12 Análises estatísticas

Todas as análises foram feitas com auxílio do programa GraphPad Prism (versão 8.0 para Windows). Os valores de ponto de corte foram calculados a partir da média dos resultados da densidade óptica dos soros controle negativos somados de ± 2 desvios padrão.

Também foi estabelecida uma zona cinza definida por um desvio padrão acima e um abaixo do ponto de corte. Para cada peptídeo se adotou um índice de reatividade, o qual foi obtido com a divisão dos valores de densidade óptica dos animais infectados pelos valores obtidos nos controles negativos.

4. RESULTADOS

4.1 Banco de dados relacional

O banco de dados utilizado para a obtenção do proteoma contava com 8.241 proteínas preditas, que ao serem submetidas aos algoritmos de predição retornaram para cada algoritmo 47.482 epítomos de acordo com o BepiPred, 957.493 de acordo com o BCPred12 e 2.361.313 de acordo com o AAP12. Foi então utilizado *script* que selecionou peptídeos pertencentes a 5 proteínas, as quais foram preditas por todos os três algoritmos preditores e que eram secretadas/excretadas ou pertenciam a membrana celular: LinJ.18.1500, LinJ.32.0970, LinJ362160, LinJ.28.1850 e LinJ.19.0350. Essas proteínas foram então avaliadas quanto sua importância biológica.

4.2 Elaboração da rede de interação proteína-proteína (PPI)

Após seleção dessas 5 proteínas seguiu-se para a análise de sua importância biológica utilizando da rede *Protein-Protein Interaction* PPI. Os resultados obtidos pelos programas STRING v.11 e Cytoscape v. 3.8 e enriquecidos pelos dados obtidos pelas vias de KEGG são apresentadas na figura 1. Os resultados mostraram que a proteína LinJ.18.1500 pertence a via de fosforilação oxidativa interagindo com outras proteínas da mesma via. LinJ.19.0350 participa do metabolismo do ácido alfa lipóico e interage com genes relacionados a diferentes vias, principalmente vias metabólicas, biossíntese de metabolitos secundários, metabolismo de carbono, biossíntese de aminoácidos e ciclo do citrato e metabolismo do glioxilato e dicarboxilato. Pertencendo a via de proteassoma, LinJ.28.1850 se mostra relacionado a ribossomas, proteólise mediada por ubiquitina e interconversões de pentose e glucuronato.

LinJ.32.0970 e LinJ.36.2160 estão relacionadas a vias metabólicas e interação, principalmente, com genes ligados a fosforilação oxidativa, fagossomo e via de biossíntese de N-Glycan.

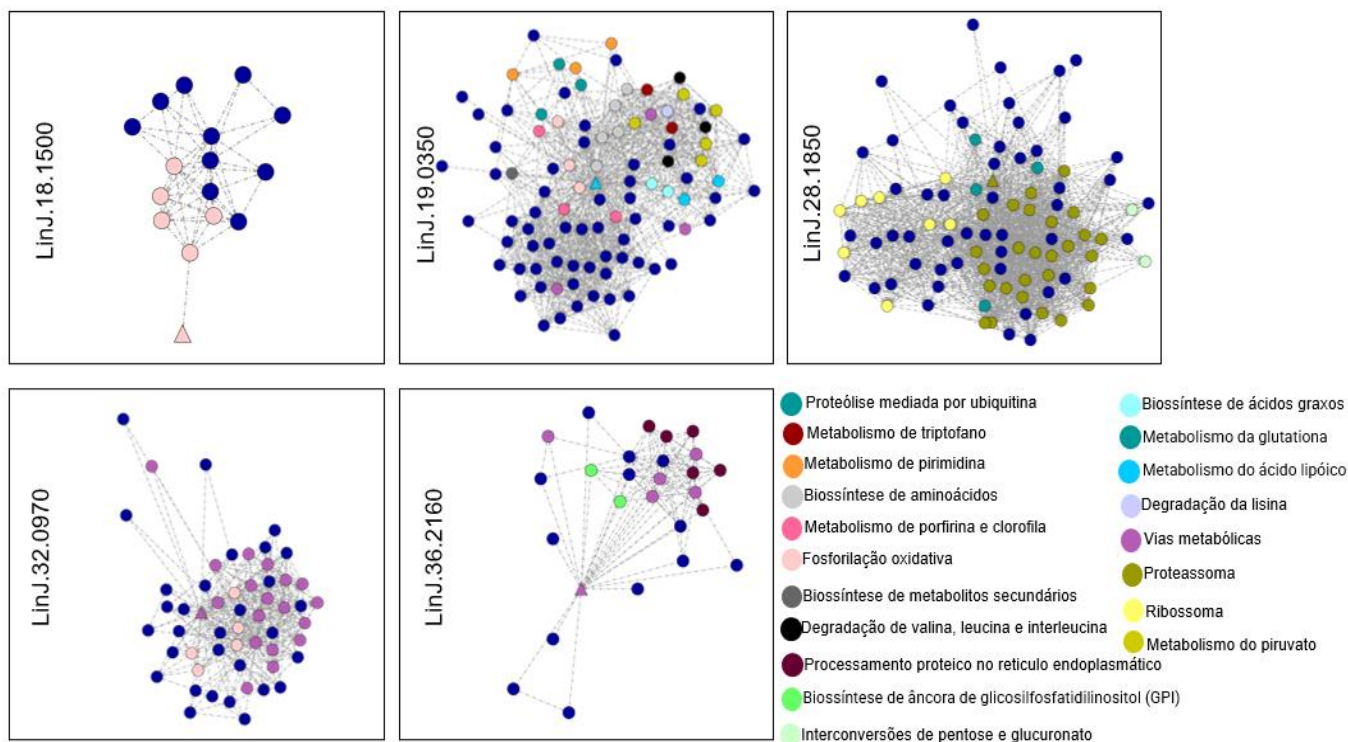


Figura 2-Proteínas imunogênicas mapeadas por redes de interação proteína-proteína (PPI). Construídas a partir das proteínas alvo representadas por triângulos e vias específicas representados por cada nó (círculos) com auxílio de banco de dados KEGG.

4.3 Identificação de epítomos e avaliação de similaridade

Pertencentes a essas proteínas foram selecionados 10 peptídeos como potenciais epítomos para células B. Os escores de predição de cada peptídeo para cada um dos três algoritmos de predição estão representados na Tabela 1.

Tabela 1- Peptídeos componentes das proteínas selecionadas com maiores escores de predição. São mostrados a identificação do peptídeo (ID), sequência proteica, posição, escores de predição e identificação da proteína ao qual pertencem.

ID Peptídeo	Seqüência do peptídeo	Posição	Escore de predição			ID Proteína
			AAP12	Bepipred	BCPred12	
45	VDPNFQFFHLPVLMF	692-706	0,90	0,80	0,80	LinJ.18.1500 (XP_001464963)
46	EGYSSQYYENSWFHRL	763-777	0,90	0,97	0,80	

47	WAPISEQKGTTYPTTPNGLP V	493-507	1,00	1,28	1,00	LinJ.32.0970 (XP_001467777)
48	FALIRQGFESFPPTPKT	374-390	1,00	1,67	0,98	LinJ.36.2160 (XP_001469796)
50	LAVQPAPSTSDAAGA	288-302	0,90	1,47	0,98	LinJ.28.1850 (XP_001470212)
51	AYQETPESERAELPP	115-129	0,90	1,25	0,98	
52	LPKGPSVPTLPYQEA	443-457	0,90	1,10	0,99	
53	SRRPPPLDPEEPEKV	171-185	1,00	1,74	1,00	LinJ.19.0350 (XP_001464998)
54	GLGEEEKEVRQTLRDLR	304-320	1,00	1,00	0,96	
55	CVERITPRVRDRRASYKQS	262-276	1,00	0,61	1,00	

Os resultados da avaliação de similaridade realizada por meio do algoritmo BLASTp são mostrados na tabela 2. É possível notar que para os peptídeos 50 e 52 ao 55 não foi encontrada similaridade com *Ehrlichia*. Além disso todos os peptídeos apresentaram identidade de 100% e baixo valor-e para *L. donovani*. Já para *L. braziliensis* os valores de identidade foram menores, não chegando a 100% para nenhum dos peptídeos, além do que o valor-e foi maior que 10 para os peptídeos 46 e 50. A identidade para *L. major*, no geral, foi maior se comparada a *L. braziliensis*, ainda assim pode ser observado que o peptídeo 48 apresentou o maior valor-e dentre para todas espécies de *Leishmania spp* e identidade menor que 90%. Em se tratando da similaridade da sequência com outros gêneros de patógenos observou-se que os peptídeos 46,47,48,50,51 e 52 tiveram elevado valor-e e/ou baixa identidade.

Tabela 2-Valores de similaridade obtidos pelo BLASTp de cada peptídeos quando confrontados a proteoma de outras espécies de parasitos. Os asteriscos (*) indicam ausência de sequência similar, os valores de identidade são indicados em porcentagem (%).

ID Peptideo	Similaridade											
	<i>L. donovani</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. major</i>		<i>T. cruzi</i>		<i>Ehrlichia</i>		<i>Babesia</i>	
	Valor-e	Identidade	Valor-e	Identidade	Valor-e	Identidade	Valor-e	Identidade	Valor-e	Identidade	Valor-e	Identidade
45	8E-11	100	1E-08	92,86	1E-09	93,33	2E-08	86,67	23	85,71	14	77,78
46	6E-12	100	18	62,5	9E-09	87,5	19	66,67	83	85,71	13	100
47	1E-14	100	2E-11	85	1E-14	100	48	61,11	69	76,92	38	71,43
48	2E-11	100	2E-07	87,5	44	85,71	22	75	11	80	44	100
50	2E-07	100	28	69,23	3E-05	92,86	61	78,57	*	*	57	90
51	3E-09	100	3E-07	92,86	3E-09	100	16	77,78	33	75	11	53,33
52	7E-09	100	2E-07	93,33	7E-09	100	40	80	*	*	66	64,29
53	2E-09	100	1E-08	93,33	2E-09	100	2E-05	80	*	*	16	85,71
54	6E-11	100	3E-09	94,12	8E-09	94,12	2E-07	88,24	*	*	39	70
55	9E-14	100	2E-11	89,47	1E-12	94,74	1E-10	89,47	*	*	21	77,78

4.4 Predição da estrutura tridimensional da porção de IgG canino

A estrutura tridimensional da cadeia pesada gama da imunoglobulina IgG de cão foi modelada utilizando RaptorX. Ao ser analisado, o modelo apresentou valores de -7,4 para o escore Z e 93,6% dos resíduos se apresentaram em regiões favoráveis, os dados dessas análises foram obtidos com auxílio dos servidores ProSA e RAMPAGE respectivamente.

O modelo apresentado na figura 3a representa a estrutura da cadeia pesada gama da imunoglobulina (IgG) de cão após refinamento, que foi realizado com auxílio do servidor GalaxyWEB. O modelo refinado foi então confrontado, também, com os algoritmos para validação ProSA e RAMPAGE, assim, encontramos aumento de aumento de 3,4% de resíduos em regiões favoráveis (97%) (figura 3b) acordo com o diagrama de Ramachandran e um escore Z de -7,58(figura 3c), indicando a boa qualidade estrutural do modelo.

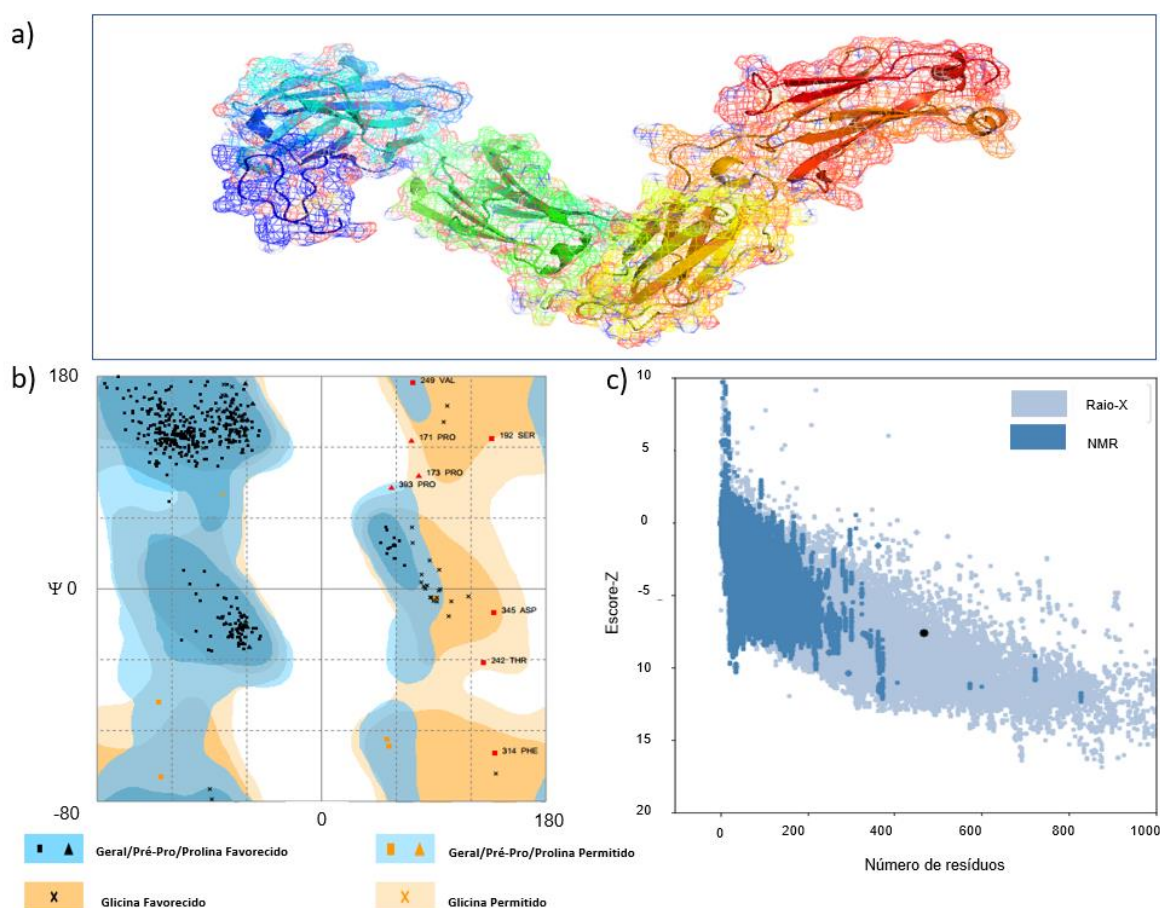


Figura 3- Modelo e validação da estrutura da cadeia pesada gama de imunoglobulina de *Canis familiaris* após refinamento. (a) Modelo tridimensional da estrutura após refinamento. (b) Diagrama de Ramachandran mostrando a distribuição dos aminoácidos em regiões favorecidas, permitidas e não permitidas. No geral, 97% dos resíduos se apresentam em região favorecida, 1,3% em região permitida, enquanto 1,7% se mostram em região não permitida, respectivamente. (c) O ponto preto representa o valor do escore Z (-7,58) previsto pelo PROSA-web se comparado a valores de bancos de dados.

4.5 Atracagem dos complexos peptídeo-proteína

O arranjo dos complexos obtidos pelo servidor CABS-dock a partir da atracagem entre cada um dos 10 peptídeo e a porção do anticorpo refinada e validade é mostrada na figura 4. Todos os complexos gerados apresentaram valores de RMSD menores que 3 Å enquadrando 9 dos 10 peptídeos como de alta qualidade quanto a predição com exceção do peptídeo 53, de acordo com seu RMSD é classificado como de média qualidade quanto a predição.

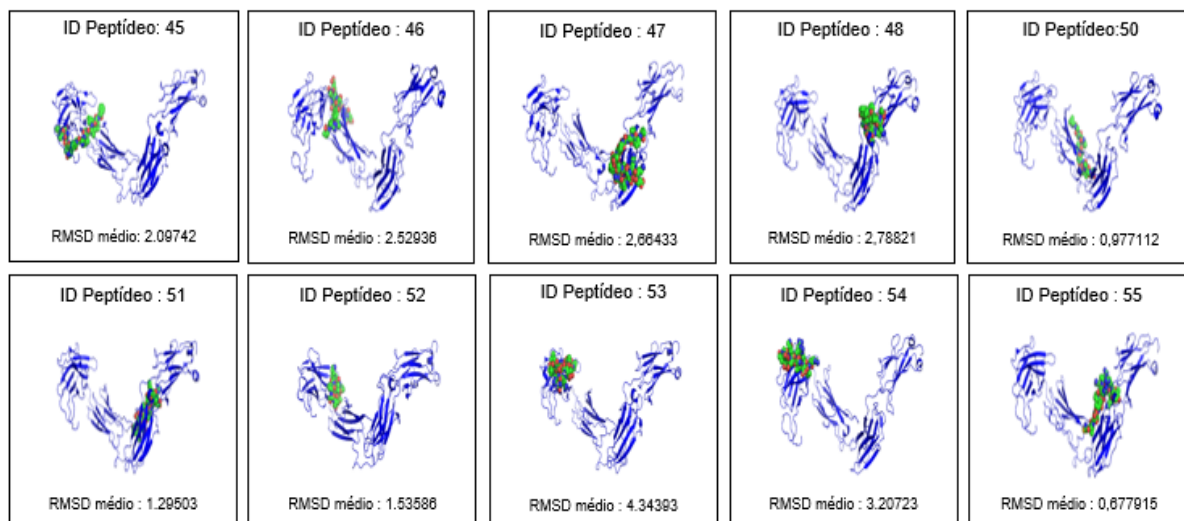


Figura 4- Complexos formados a partir do atracamento dos peptídeos e cadeia pesada gama da imunoglobulina de cão. A atracagem e RMSD do modelo final de cada peptídeo é mostrado em seus respectivos painéis, as esferas estão mostrando cada peptídeo, enquanto a cor azul é a porção do anticorpo.

4.6 Dinâmica molecular dos complexos peptídeo-proteína

A distância estrutural do complexo foi medida por simulação de DM, a figura 5 representa as flutuações estruturais em função do tempo, em nanossegundos, onde as diferentes cores das linhas assinalam os diferentes peptídeos. Os valores finais de RMSD de cada complexo foram de 7,8; 15,0; 11,7; 9,7,10,7; 11,4; 12,6; 8,6; 10,4 e 13,5 Å para os peptídeos 45; 46; 47; 48; 50; 51; 52; 53; 54 e 55, respectivamente.

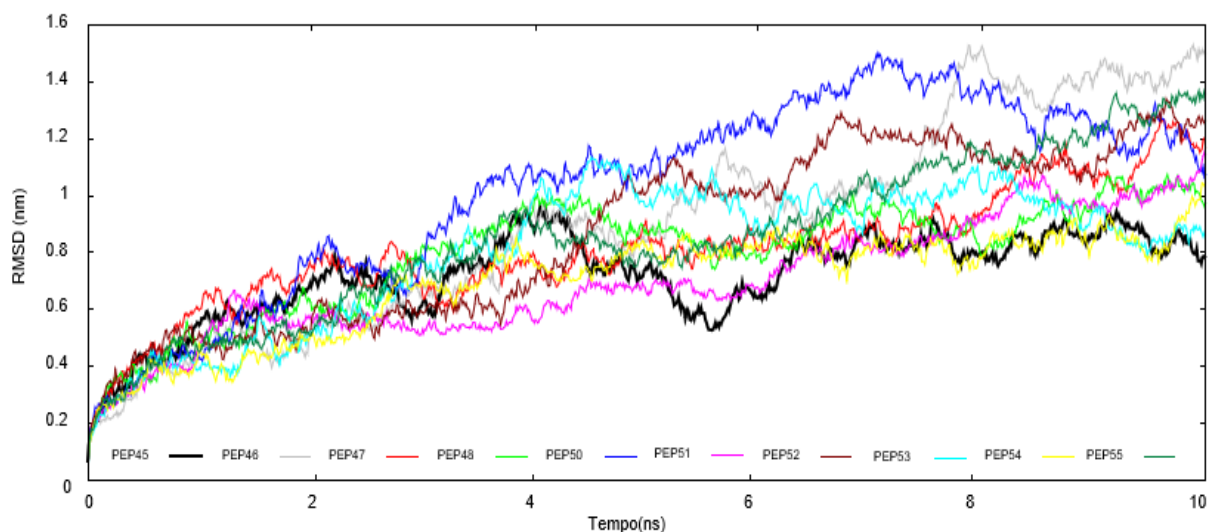


Figura 5- Dinâmica molecular mostrando a estabilidade residual e flutuações i-e (RMSDs). Simulação das flutuações durante os 10 nanossegundos de simulação. Cada uma das diferentes cores representam o complexo formado após o atracamento para cada peptídeo.

4.7 Padronização da técnica de ELISA utilizando peptídeos

Primeiramente, como prova de conceito e validação do potencial diagnóstico dos peptídeos preditos, testes piloto foram realizados a fim de obter reações que diferenciasssem cães infectados com *L. infantum* (CI) de cães não infectados (CNI), a primeira etapa dos testes *in silico* foi a realização da reação de ELISA. Inicialmente foram utilizados somente 2 peptídeos para avaliar suas concentrações em cada 100 μL (0,25 μg e 0,5 μg) em diferentes diluições de soro e do conjugado IgG anti-cão. Nessa etapa foram utilizados somente dois peptídeos (48 e 51), visto ser um teste piloto. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3- Valores obtidos em densidade ótica na reação ELISA para diferentes concentrações de peptídeo e diluições de soro e conjugado.

Diluição da Amostra		PEP48						PEP51						
		1:200		1:400		1:600		1:200		1:400		1:600		
Concentração de peptídeo	0,25 μg	CI	1,64	1,21	1,02	0,91	0,82	0,62	1,43	1,13	0,97	0,73	0,68	0,53
		CNI	0,26	0,20	0,16	0,15	0,11	0,10	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,09
	0,5 μg	CI	1,42	1,12	0,99	0,75	0,65	0,56	1,37	1,08	0,96	0,73	0,65	0,52
		CNI	0,22	0,17	0,15	0,12	0,10	0,08	0,19	0,16	0,13	0,11	0,10	0,09
Diluição do Conjugado		1:16000	1:20000	1:16000	1:20000	1:16000	1:20000	1:16000	1:20000	1:16000	1:20000	1:16000	1:2000	

Após isso, a fim de obter curvas de diluição que mostrassem uma condição ideal de diluições do soro e do conjugando IgG anti-cão curvas de diluição foi realizada a ELISA de todos os 10 peptídeos em concentração de 0,25 μg .

Na figura 6 pode ser observada a capacidade de todos os peptídeos em diferenciar animais infectados de não infectados nas três diferentes diluições de soro (1:200, 1:400 e 1:600)

e nas três diferentes diluições do anticorpo (1:16.000, 1:20.000 e 1:24.000). As diluições mais concentradas de anticorpo e menos concentradas de amostra tiveram densidade óptica menor nas amostras de soro dos cães não infectados com relativa manutenção dos altos valores no soro de cães infectados. A fim de homogeneizar a reação para todos os peptídeos sem que, no entanto, a diferença de reatividade relativa entre cães saudáveis e infectados por *L. infantum* fosse prejudicada, as diluições de 1:600 para a amostra e 1:16:0000 para o anticorpo foram utilizadas na etapa posterior.

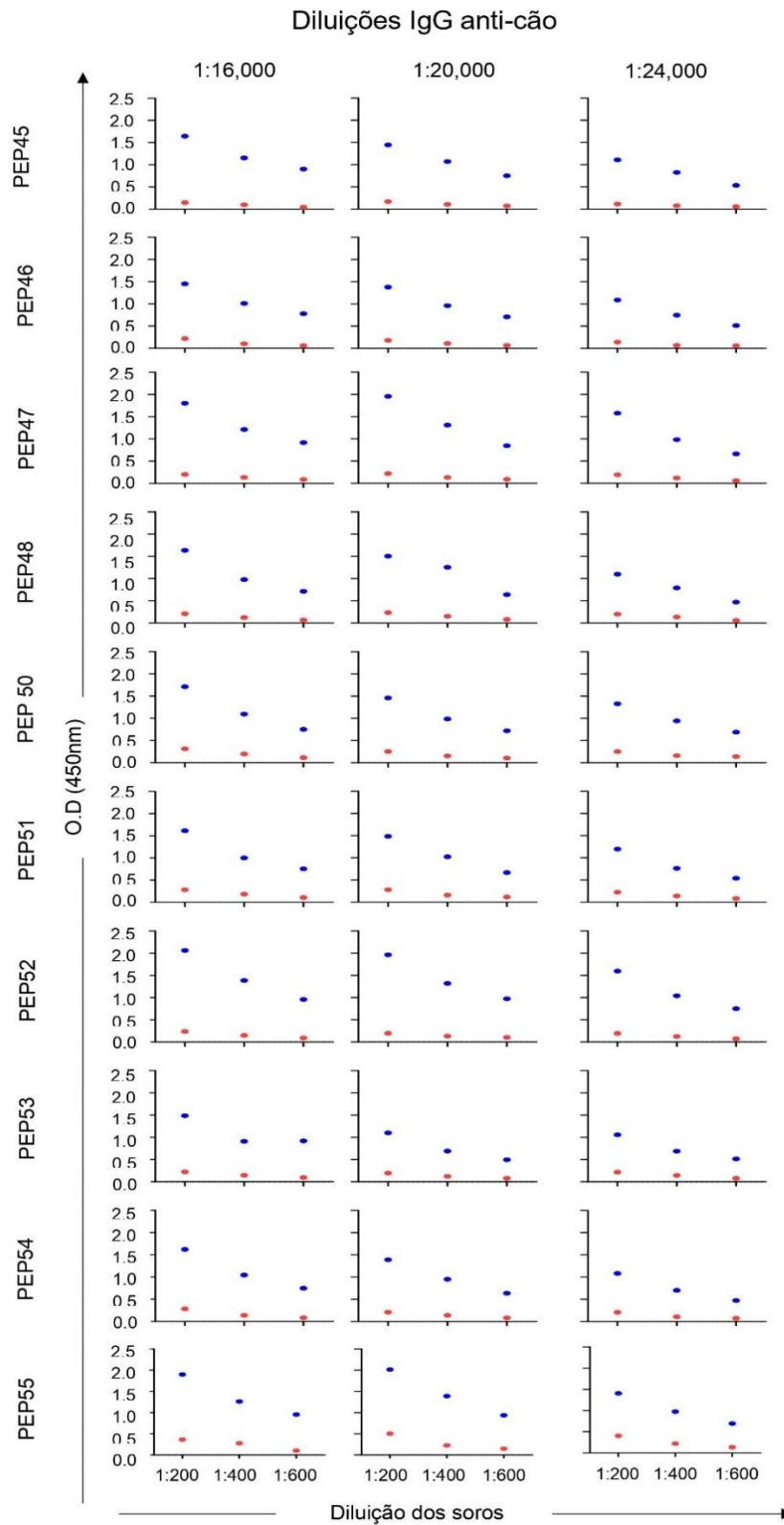


Figura 6- Padronização da reatividade sorológica a fim de avaliar as melhores condições para todos os peptídeos. O desempenho foi avaliado em pools de soros de cães CI (●) e CNI (●). Para isso, foi realizada uma titulação de soro usando diluições de 1:200, 1:400 e 1:600, e também diferentes diluições de IgG anti-cão (1:16.000, 1: 20.000 e 1: 24.000).

4.8 Avaliação da técnica de ELISA utilizando peptídeos para validação do potencial diagnóstico para LVC

Após a padronização e a fim de avaliar os peptídeos como componentes de teste imunodiagnóstico utilizando amostras individuais de soro, foram realizadas reações de ELISA usando as 20 amostras previamente caracterizadas de 10 animais infectados (CI) e 10 animais não infectados (CNI). Nessas reações foram escolhidas as diluições de 1:600 e 1:16.000 para soro e anticorpo respectivamente. Como resultado foi possível observar que todos os peptídeos mostraram a capacidade de distinguir animais infectados por *L. infantum* (figura 7).

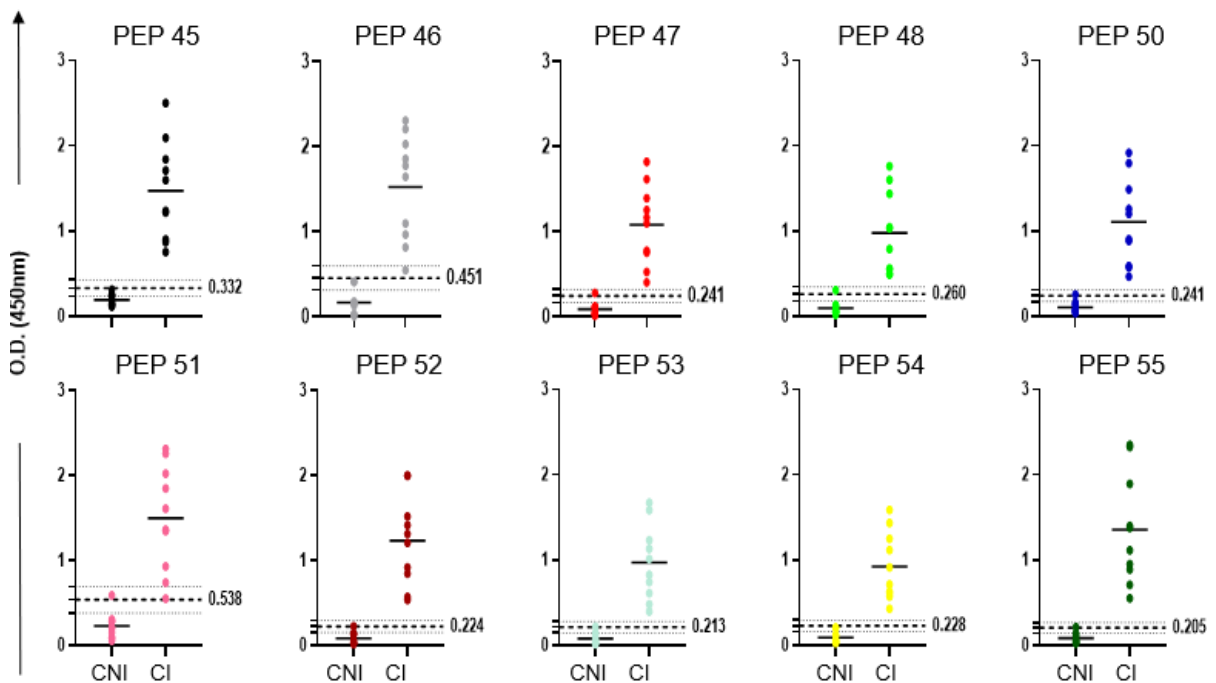


Figura 7-Distribuição dos resultados de densidade óptica dos controles negativos e positivos que foram testados usando os diferentes peptídeos. A linha espessa pontilhada representa o ponto de corte para cada ensaio, enquanto as linhas pontilhadas finas delimitam a zona cinza

Por meio da média dos valores obtidos na realização de ELISA individual, foi então obtido o índice de reatividade para cada peptídeo (figura 8). Ao observar esse índice é possível notar que todos os peptídeos separaram de forma significativa animais infectados de animais não infectados por *L. infantum*, sendo o peptídeo 45 o com maior e o peptídeo 53 com menor diferença entre os valores de densidade óptica.

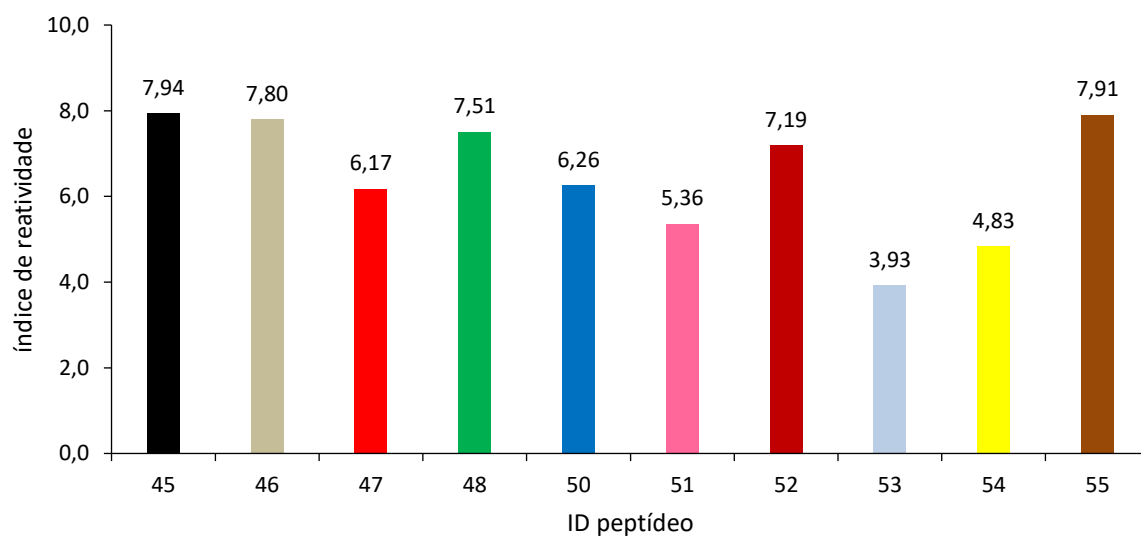


Figura 8-Índice de reatividade para cada peptídeo. São representados os índices de reatividade calculados a partir do quociente da média dos valores positivos pelos valores negativos das amostras de cada peptídeo. As diferentes cores mostram os diferentes peptídeos

5. DISCUSSÃO

A bioinformática já se mostrou promissora na identificação de potenciais antígenos para vacinas ou diagnóstico de doenças infectoparasitárias, apresentando como um dos maiores benefícios a diminuição do tempo necessário para essa prospecção e redução de custos dos mesmos e principalmente o ganho no desempenho diagnóstico, considerando o aumento nos índices de especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade (HEYDUK et al., 2018; DE BRITO et al., 2020b).

Em se tratando do diagnóstico sorológico da LVC, deve-se considerar principalmente os entraves relacionados a sensibilidade e ou especificidade, que podem ter um impacto negativo no diagnóstico. Estes aspectos são reforçados considerando a recomendação de remoção e eutanásia dos animais soropositivos e suas consequências tanto do ponto de vista de saúde pública quanto em relação ao impacto emocional dos proprietários pela perda de seu animal de companhia (LOPES et al., 2017; DE CARVALHO et al., 2018; SALLES et al., 2019). No entanto as características práticas quanto a custo e execução dessas técnicas sorológicas ainda as tornam atrativas, o que justifica a utilização das mesmas, por exemplo, nos programas de controle e profilaxia da LV no Brasil (BRASIL, 2019; DUTHIE; LISON; COURTENAY, 2018).

Ainda quanto ao diagnóstico, deve ser levado em consideração a possibilidade de resultados errôneos, que impactam diretamente nas medidas de controle da doença, acarretando na eutanásia de cães falso positivos (COSTA et al., 2020). Sendo assim, muitos são os fatores que reforçam a ideia de que a busca por novos antígenos para refinar o diagnóstico sorológico assertivo podem ser uma solução viável para resolução dos problemas relacionados ao diagnóstico imunológico da LVC (DE BRITO et al., 2020a).

A fim de contribuir na prospecção por componentes desses testes, nosso estudo primeiramente, utilizou da busca em banco de dados relacional, a fim de identificar peptídeos com elevado desempenho e potencial para serem utilizados como antígenos para teste diagnóstico da LVC (BRITO et al., 2017). A busca nesse banco de dados se baseou na considerável acurácia da metodologia empregada na construção do mesmo, que foi embasado na premissa de que para que a predição seja eficiente, em especial para protozoários, é recomendado não somente um método de predição, mas sim a combinação de diferentes algoritmos (RESENDE et al., 2012).

No presente estudo, foram identificados epítomos lineares para células B de acordo com os escores obtidos a partir de três algoritmos de predição: BepiPred, AAP12 e BCPred12. Os valores encontrados para todos os peptídeos foram superiores a 0,5 tanto para AAP12 quanto

para BCPred12, tais valores foram considerados promissores visto que, resultados acima de 0,5 obtidos em outros estudos, não só para *Leishmania*, mas também para a predição de antígenos de outros agentes infecciosos e parasitos como o *Schistosoma mansoni* foram considerados satisfatórios (RESENDE et al., 2012; CARVALHO et al., 2017). O terceiro algoritmo de predição, BepiPred foi utilizado por sua grande eficiência como preditor de epítomos lineares de células B, além das suas características mais restritivas quando comparado aos anteriores, principalmente em se tratando de protozoários (DHUSIA; KESARWANI; YADAV, 2016; WANG et al., 2018). Deve-se ainda considerar que a utilização de algoritmos para predição de moléculas antigênicas não é exclusiva para células B, trabalhos que utilizaram de peptídeos relacionados a células T, derivados do mesmo banco de dados utilizado no presente estudo, já se mostraram promissores como candidatos vacinais, uma vez que foram capazes de gerar um perfil de proteção, quando componentes de quimeras, em resultados *in vivo*, reafirmando o potencial desses algoritmos de predição já empregados no *pipeline* de imunoinformática elaborado pelo nosso grupo (DE BRITO et al., 2020b; OSTOLIN et al., 2021). Ainda quanto ao presente estudo, vale ressaltar que mesmo os peptídeos que não obtiveram scores muito elevados em todos os três algoritmos de predição foram considerados para as análises posteriores, a fim de diminuir a possibilidade de descartar seu potencial, visto a obtenção de um alto score mesmo que em apenas um algoritmo de predição, pode esconder potenciais alvos para o diagnóstico.

A elaboração das redes PPI e KEGG permitiram avaliar também as vias relacionadas a proteínas que continham esses antígenos. A análise dessas redes de interação mostraram a interrelação entre os genes selecionados e outros de diferentes vias, evidenciando o potencial antigênico para uso no diagnóstico da LVC, visto o papel essencial nos processos biológicos desses genes em algumas espécies de *Leishmania* spp. (ALCOLEA et al., 2009; BENÍTEZ et al., 2016). Assim, o mapeamento das redes PPI foi utilizado no intuito de prover informações biológicas sobre a importância dos genes selecionados na biologia do parasito. Sabendo-se que genes importantes para a biologia dos organismos podem ser potenciais alvos para testes de droga e diagnóstico (LIU et al., 2014).

Dentre as vias relacionadas aos genes selecionados, podemos citar os que participam de funções ligadas a ribossomos, que durante as infecções da *Leishmania* desempenham papel importante, já que podem modular atividades celulares, como liberação de citocinas e ainda podem participar do balanço das respostas imunes dos tipos Th1/Th2 durante o desenvolvimento da história natural da leishmaniose visceral e de seus diversos

desdobramentos ou desfechos clínicos (CORDEIRO-DA-SILVA et al., 2001; IBORRA et al., 2008).

Também é descrito que a maioria das proteínas secretadas responsáveis pela virulência da *L. donovani* são relacionadas principalmente a vias metabólicas e processos de biossíntese. Além disso, já foi demonstrado que parasitos que não possuem genes relacionados a proteína quinases ou fosfatases podem se tornar não virulentos ou ter sua virulência atenuada dada a relação entre esses genes e a regulação do metabolismo da *Leishmania* (MAXWELL et al., 2008; MCCONVILLE; NADERER, 2011). As vias metabólicas se mostram ainda, importantes devido a relação com o comportamento de latência em algumas espécies de parasito, além do que a inibição de função proteossomal pode prejudicar a diferenciação morfológica de estádios específicos devido a consequentes falhas na replicação de organismos como *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma* e *Plasmodium* (MUÑOZ et al., 2015).

Em vista disso, deve-se considerar o potencial dos peptídeos selecionados para o diagnóstico sorológico, visto que estão relacionados de forma direta ou indireta a importantes funções biológicas das diferentes espécies do gênero *Leishmania sp.*

Posteriormente foi realizada a avaliação de similaridade entre os peptídeos selecionados e alguns dos patógenos que podem ser observados em situações de coinfeção ou que já mostraram resultar em reações cruzadas, devido a compartilhamento de epítomos, em testes diagnósticos para LVC (TRONCARELLI et al., 2009; KRAWCZAK et al., 2015). Em se tratando de outras espécies analisadas que pertencem ao gênero *Leishmania sp.* pôde ser observado alto valor de similaridade para todos os peptídeos, valor menos significativo para a *L. braziliensis*. No entanto a identidade entre *L. infantum* e *L. donovani* mesmo com valores se mostrando elevados não descarta completamente a possibilidade da utilização dos peptídeos para o diagnóstico, visto que ambas as espécies podem levar a condição da LV, além disso, deve-se ainda atentar ao fato de que, quanto a distribuição geográfica, *L. donovani* é considerada uma espécie pouco prevalente no novo mundo, o que pode diminuir a possibilidade de reações cruzadas em testes utilizando amostras providas de território nacional (JAMJOOM et al., 2004; CARNIELLI et al., 2018). Já os resultados observados para os peptídeos 46, 48 e 50 quanto à similaridade com *L. braziliensis* e *L. major*, principalmente quanto ao valor-e, denotam a possibilidade em explorar os mesmos para estudos futuros como possíveis antígenos para diagnóstico da leishmaniose visceral, visto a relação entre as formas clínicas e a espécie causadora da doença (BANETH et al., 2017; SOLOMON et al., 2019). Já quando comparados aos parasitas pertencentes não pertencentes ao gênero *Leishmania sp.* os peptídeos tiveram

menor similaridade, principalmente os peptídeos 46,47,48,50,51 e 52 que apresentaram altos valores-e. Tais valores estão relacionados a possibilidade de um evento ocorrer ao acaso, assim, quanto maior o valor, menor a confiabilidade nos resultados, incluindo o os obtidos quanto a identidade entre sequências (VANDERWEELE; DING, 2017).

Após a análise de similaridade foi também realizada a modelagem da cadeia pesada gama da imunoglobulina IgG de cão, devido, em parte, ao pequeno número de estruturas validadas de proteínas de cão se comparado, por exemplo, proteínas de camundongo. A fim de contornar a ausência da estrutura de um anticorpo de cão em bancos de dados *online* e gratuitos, seguimos para a modelagem *in silico*, que foi escolhida devido a possibilidade de geração de modelos interessantes quando se considerada sua qualidade em comparação a métodos tradicionais como cristalografia de raios X(XU; WANG, 2019). A predição de estruturas por metodologia *in silico* não é inédita, exemplo disso foi o estudo realizado por Camargo e colaboradores (2020) que utilizaram da modelagem comparativa para a predição do modelo tridimensional da leishmanolisina (GP63) derivada de *L. panamensis* a fim de avaliar sua interação com flavonoides na busca por candidatos a drogas leishmanicida (MERCADO-CAMARGO et al., 2020).

Mersham e colaboradores (2020) também utilizaram a modelagem *in silico* partir de sequência, nesse caso proteica, para estudos de atracamento e dinâmica molecular da treonina sintase (TS) associado ou não a fosfato de piridoxal. Foi observado como um dos resultados desse estudo a modelagem, por homologia, de modelo com qualidade suficiente para identificar o potencial da TS como alvo para drogas com atividade leishmanicida (MESHRAM et al., 2020).

Em nosso estudo, considerando os resultados obtidos nos dois métodos de validação empregado, o modelo tridimensional gerado pelo método *in silico* se mostrou com qualidade satisfatória após o refinamento (GORE et al., 2017; ADIYAMAN; MCGUFFIN, 2019). Essa qualidade pode ser notada e atestada nos resultados obtidos no ProSA e observados no diagrama de Ramachandran, tais resultados reforçaram o incentivo ao uso do modelo refinado para a técnica de atracagem molecular (PATRA et al., 2019).

A próxima etapa deste estudo foi realizada, também, com o intuito de complementar a análise de predição e ilustrar a capacidade de ligação entre os peptídeos selecionados e uma molécula biológica, foi então realizada a atracagem entre peptídeo e porção do anticorpo. Nesse contexto, cabe lembrar que o atracamento computacional entre peptídeo e anticorpo pode ser um desafio e que diferentes métodos, que variam de acordo com a situação a ser elucidada,

levam em conta fatores como o tamanho e mudanças conformacionais da molécula (LONDON; RAVEH; SCHUELER-FURMAN, 2013; CIEMNY et al., 2018).

Quanto a atracagem, estudo prévio para predição de epítomos seguidos de atracamento molecular utilizou de algoritmos que trataram a molécula como rígida, o complexo antígeno anticorpo se aproximava do nativo desde que apresentasse RMSD menor que 10Å (KRAWCZYK et al., 2014). No nosso estudo, utilizamos o servidor CABS-dock com intenção de considerar a flexibilidade das moléculas durante a atracagem molecular. Considerar essa flexibilidade foi uma tentativa de diminuir a omissão de possíveis conformações, que poderiam não ser apresentadas quando uma ou ambas as estruturas fossem consideradas rígidas, o que não reflete o comportamento do anticorpo em sistemas biológicos (KURCINSKI et al., 2020). Nossos resultados de atracagem mostraram resultados de RMSD que variavam de 0,67 a 4,74 Å, que de acordo com o protocolo proposto pelo servidor mostraram que nenhum dos complexos se categorizam como de baixa qualidade (BLASZCZYK et al., 2019).

A última etapa *in silico* desse estudo foi realizada com intensão de estimar as perturbações em meio líquido, do complexo como um todo. Para isso a utilização da DM foi escolhida visto a importância de reconhecer a estabilidade de complexos biológicos, além da utilização de simulações de DM em estudos que incluem interações entre proteínas e peptídeos, como pode ser observado nas simulações realizadas em complexos de antígeno de leucócito humano (HLA) ligados a antígenos de *Leishmania*, que resultaram em baixos valores, aproximadamente 2 Å, de RMSD (AKYA et al., 2019).

Em 2020 Moazzezy e colaboradores usaram simulações de DM com objetivo de analisar a dinâmica molecular de complexos compostos de peptídeos e lipídeos, nessas simulações os 10 primeiros nanossegundos mostraram flutuações na estrutura que decresceram de acordo com o tempo, no entanto é necessário lembrar que para simulações mais longas se torna necessária maior robustez dos equipamentos computacionais, inviabilizando em determinadas situações simulações longas (MOAZZEZY et al., 2020).

Já em nosso estudo as simulações foram realizadas durante 10 nanossegundos, os valores finais, no entanto se mostraram relativamente altos, mesmo para os complexos contendo os peptídeos 45 e 53, que tiveram os menores valores de RMSD. No entanto é importante lembrar que aumentar o tempo de simulação de DM pode mostrar variações da estabilidade estrutural devido a possíveis variações de valores de RMSD em relação ao tempo (ZHANG, 2009; POOSARLA et al., 2017; MOAZZEZY et al., 2020). Ainda assim o tempo utilizado nesse estudo pode ser comparado ao usado em trabalhos que analisaram atividades inibitórias

de enzimas ou mudanças estruturais em componentes de membrana celular (TAI et al., 2002; LOPEZ et al., 2004).

Considerando o fato de que os testes imunoenzimático (ELISA) e imunocromatográfico (DPP®), dentre todos os testes sorológicos utilizados na rotina para o diagnóstico da LVC, são os mais comuns, a tentativa de desenvolver técnica única com altas sensibilidade e especificidade se torna essencial (DE BRITO et al., 2020a). Em vista disso e dos resultados obtidos, foi realizada neste estudo a avaliação dos potenciais peptídeos como componentes da reação imunoenzimática ELISA para o sorodiagnóstico da LVC.

Com objetivo de validar nosso fluxo de seleção de epítomos *in silico* buscamos ainda uma prova de conceito por meio do ensaio de ELISA. Para tal, utilizando-se das amostras individuais de soro canino foi realizado primeiramente um teste piloto, a fim de determinar uma concentração ideal de cada peptídeo selecionado. Tal concentração pode variar conforme o antígeno e ou as condições de reação, assim, nas reações de ELISA utilizando peptídeos ou antígenos recombinantes, podem ser observadas diferentes concentrações de antígeno. Exemplo disso foi observado por Magalhães e colaboradores, para proteínas recombinantes, que utilizaram uma concentração de 400ng por poço, enquanto Costa et al. escolheram uma concentração de 5µg/mL, dessa vez utilizando peptídeos sintéticos (LIU et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2017). Considerando a possibilidade de variação de concentração de antígeno em diferentes estudos e os valores de absorvância de amostras negativas e positivas, muito similares para as duas concentrações de peptídeo testadas, no presente trabalho, utilizou-se a concentração de 0,25 µg de peptídeos para cada 100µL. Após definir a concentração de peptídeo, foram então realizadas curvas de diluição, a fim de obter melhores diluições tanto da amostra quanto do conjugado de anticorpo IgG canino, foram escolhidas as condições onde a separação entre soro de animais infectados e não infectados era nítida e os valores de absorvância das amostras de soro negativa foram menores. Sendo assim foram escolhidas as diluições 1:600 e 1:16.000 para amostras de soro e conjugado, respectivamente.

Com os parâmetros para o ensaio de ELISA definidos, partiu-se para a avaliação dos peptídeos em amostras individuais de soro canino. Os resultados mostraram a capacidade de todos os peptídeos em diferenciar animais infectados com *L. infantum* de animais saudáveis, ainda assim, alguns indivíduos se mostraram acima do ponto de corte. No entanto é importante ressaltar que algumas das amostras de soro se mantiveram na zona cinza, fator que deve ser levado em consideração quando observada a capacidade de distinção de indivíduos positivos e negativos (COSTE; POUCHOT, 2003).

Além disso, utilizando as médias dos resultados positivos e negativos para cada peptídeo, foi possível demonstrar o quão reativo eram as amostras de cães infectados em relação aos não infectados. Sendo que, o peptídeo com maior índice de reatividade conseguiu diferenciar em aproximadamente oito vezes amostras positivas das amostras negativas, já o com menor índice diferenciou em aproximadamente quatro vezes essas amostras. Ainda assim não é possível definir com clareza a sensibilidade e ou especificidade dos testes para cada peptídeo visto o perfil epidemiológico e a quantidade das amostras utilizadas. No entanto metodologias de seleção de epítomos utilizando de algoritmos preditores, mesmo com que com número menor de análises *in silico* mostraram sensibilidade e especificidade maior que maior que 75% e especificidade maior que 90% (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2013). Deve-se ainda considerar que a utilização de peptídeos já se mostrou superior para o diagnóstico sorológico da LVC se comparado ao kit diagnóstico recomendado pelo Ministério da Saúde (TRAVI et al., 2018; DE BRITO et al., 2020a)

Em suma, se considerados nossos resultados em relação aos parâmetros avaliados *in silico*, o peptídeo 53 obteve o maior score quando considerados todos os três algoritmos e os peptídeos 45 e 55 obtiveram melhor desempenho quanto a dinâmica e atracagem molecular, respectivamente. Já se considerados os resultados dos ensaios *in vitro* os peptídeos 45 e 48 apresentaram melhores resultados quanto ao índice de reatividade e valor da média das amostras negativas, respectivamente. Além disso pôde ser observado que o peptídeo 55 mostrou bons resultados para os algoritmos de predição, atracagem, índice de absorbância e baixa absorbância das amostras negativas. Em vista disso e de que, mesmo com alguns peptídeos se destacando em determinadas características, o presente trabalho mostra o potencial de todos os peptídeos como componentes de testes sorológicos para LVC.

6. CONCLUSÃO

Os nossos achados indicam a possibilidade da utilização dos peptídeos selecionados como componentes do ELISA no diagnóstico da LVC. Assim como a possibilidade de testar o atracamento empregando metodologia *in silico*, a partir da utilização de ferramentas de interface amigável e acessível. Assim nossos resultados considerados satisfatórios para todos os peptídeos nas análises computacionais somando aos resultados da ELISA demonstraram o potencial dos peptídeos selecionados por imunoinformática como peptídeos para o teste diagnóstico da LVC. No entanto reforçamos a necessidade de análises de bioinformática mais robustas quando não em conjunto a análises *in vitro*.

7. PERSPECTIVAS

Espera-se que nossos resultados incentivem a avaliação desses peptídeos quando confrontados a maior número de amostras além de diferentes perfis epidemiológicos, a fim de avaliar sua especificidade e aprofundar a avaliação de sua sensibilidade, além de testar a associação de peptídeos, por meio de mix ou quimeras, a fim de aumentar o desempenho do teste diagnóstico.

Por fim, esperamos que nossos resultados sirvam de inspiração para a contínua busca por melhorar técnicas já estabelecidas a partir da utilização de ferramentas novas, como a bioinformática não só para a LVC visto a possibilidade de extrapolação dessas técnicas a diferentes moléculas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- ADIYAMAN, R.; MCGUFFIN, L. J. Methods for the refinement of protein structure 3D models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.
- AKYA, A. et al. Identification of HLA-I restricted epitopes in six vaccine candidates of *Leishmania tropica* using immunoinformatics and molecular dynamics simulation approaches. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 75, p. 103953, 2019.
- ALAM, N.; SCHUELER-FURMAN, O. Modeling Peptide-Protein Structure and Binding Using Monte Carlo Sampling Approaches: Rosetta FlexPepDock and FlexPepBind. **Modeling Peptide-Protein Interactions** v. 1561 p. 139–169. 2017.
- ALCOLEA, P. J. et al. Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*. **Genomics**, v. 93, n. 6, p. 551–564, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: Comparative findings and serology. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.
- BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 14–15, 2008.
- BARLOW, D. J.; EDWARDS, M. S.; THORNTON, J. M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. **Nature**, v. 322, n. 6081, p. 747–748, 1986.
- BENÍTEZ, D. et al. Identification of Novel Chemical Scaffolds Inhibiting Trypanothione Synthetase from Pathogenic Trypanosomatids. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–25, 2016.
- BLASZCZYK, M. et al. Modeling of protein–peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking. **Methods**, v. 93, p. 72–83, 2016.
- BLASZCZYK, M. et al. Protein–peptide docking using CABS-dock and contact information. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 2299–2305, 2019.
- BLYTHE, M. J.; FLOWER, D. R. Benchmarking B cell epitope prediction: Underperformance of existing methods. **Protein Science**, v. 14, n. 1, p. 246–248, 2009.
- BRANCO, I.; CHOUPINA, A. Bioinformatics: new tools and applications in life science and personalized medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.105, p. 1–15, 2021.
- BRASIL, Guia de Vigilância em Saúde, Brasília:Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Epidemiológica, 2019.
- BRITO, R.C.F. **Identificação de antígenos candidatos vacinais contra Leishmaniose Visceral Canina no genoma de *L. infantum* utilizando a Bioinformática como ferramenta.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, p.112. 2014.

- BRITO, R. et al. Immunoinformatics Features Linked to Leishmania Vaccine Development: Data Integration of Experimental and In Silico Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 371, 2017.
- BRUZZONI-GIOVANELLI, H. et al. Interfering peptides targeting protein–protein interactions: the next generation of drugs? **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 2, p. 272–285, 2018.
- CARNIELLI, J. B. T. et al. A Leishmania infantum genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **EBioMedicine**, v. 36, p. 83–91, 2018.
- CARVALHO, G. B. F. et al. Selecting targets for the diagnosis of Schistosoma mansoni infection: An integrative approach using multi-omic and immunoinformatics data. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, 2017.
- CHAGAS, Ú. M. R. et al. Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by Leishmania infantum. **Veterinary Parasitology**, v. 291, 2021.
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. Sensitive and specific serodiagnosis of Leishmania infantum infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 931–944, 2013.
- CHEN, J. et al. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. **Amino Acids**, v. 33, n. 3, p. 423–428, 2007.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539–543, 1997.
- CIEMNY, M. et al. Protein–peptide docking: opportunities and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 8, p. 1530–1537, 2018.
- CLARK, M. F.; LISTER, R. M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. **Methods in Enzymology**, v. 118, p. 742–766, 1986.
- COHEN, N. C. **Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design**. Elsevier, 1996.
- CORDEIRO-DA-SILVA, A. et al. Dual role of the Leishmania major ribosomal protein S3a homologue in regulation of T- and B-cell activation. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6588–6596, 2001.
- COSTA, D. N. C. C. et al. Controle da leishmaniose visceral canina por eutanásia: estimativa de efeito baseado em inquérito e modelagem matemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, 2020.
- COSTE, J.; POUCHOT, J. A grey zone for quantitative diagnostic and screening tests. **International Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 2, p. 304–313, 2003.
- COURA-VITAL, W. et al. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91009, 2014.
- DE BRITO, R. C. F. et al. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 19, p. 8105–8116, 2020a.
- DE BRITO, R. C. F. et al. Chimeric vaccines designed by immunoinformatics-activated polyfunctional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 1–20, 2020b.

- DE CARVALHO, F. L. N. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 5, p. 571–576, 2018.
- DHUSIA, K.; KESARWANI, P.; YADAV, P. K. Epitope prediction for MSP119 protein in *Plasmodium yoelii* using computational approaches. **Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2016.
- DORN, M. et al. Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. **Computational Biology and Chemistry**, v. 53, p. 251–276, 2014.
- DUTHIE, M. S.; LISON, A.; COURTENAY, O. Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 881–890, 2018.
- EL-MANZALAWY, Y.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. **Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal**, v. 21, n. 4, p. 243–255, 2008.
- EMANUELSSON, O. et al. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. **Journal of Molecular Biology**, v. 300, n. 4, p. 1005–1016, 2000.
- FARIA, A. R. et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, 2011.
- FRAGA, D. B. M. et al. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2016.
- GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 2, p. 165–180, 1996.
- GASTEIGER, E. et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003.
- GEYSEN, H. M.; MELOEN, R. H.; BARTELING, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 13 I, p. 3998–4002, 1984.
- GIUDICELLI, V. et al. IMGT/LIGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. **Nucleic acids research**, v. 34, p. 781–784, 2006.
- GORE, S. et al. Validation of Structures in the Protein Data Bank. **Structure**, v. 25, n. 12, p. 1916–1927, 2017.
- HAILU, A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 42, n. 4, p. 251–256, 2002.
- HERRERA-NAJERA, C. et al. Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 5, p. 1293–1301, 2009.
- HEYDUK, E. et al. Peptide ligand-based ELISA reagents for antibody detection. **Analytical Biochemistry**, v. 559, p. 55–61, 2018.

- HOMMEL, M. et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 72, n. 3, p. 213–218, 1978.
- HORTON, P. et al. WoLF PSORT: Protein localization predictor. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 585–587, 2007.
- IBORRA, S. et al. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 10–11, p. 1133–1141, 2008.
- JAMJOOM, M. B. et al. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and “*L. archibaldi*” from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. **Parasitology**, v. 129, n. 4, p. 399–409, 2004.
- KÄLLBERG, M. et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. **Nature Protocols**, v. 7, n. 8, p. 1511–1522, 2012.
- KANEHISA, M. KEGG bioinformatics resource for plant genomics and metabolomics. In: **Plant Bioinformatics**. Springer, p. 55–70, 2016.
- KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins. **Naturwissenschaften**, v. 72, n. 4, p. 212–213, abr. 1985.
- KO, J. et al. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 294–297, 2012.
- KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, v. 276, n. 1–2, p. 172–174, 1990.
- KRAWCZAK, F. da S. et al. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 64–68, 2015.
- KRAWCZYK, K. et al. Improving B-cell epitope prediction and its application to global antibody-antigen docking. **Bioinformatics**, v. 30, n. 16, p. 2288–2294, 2014.
- KRINGELUM, J. V. et al. Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 1–2, p. 24–34, 2013.
- KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001.
- KUHLMAN, B.; BRADLEY, P. Advances in protein structure prediction and design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 11, p. 681–697, 2019.
- KUNDROTAS, P. J. et al. Templates are available to model nearly all complexes of structurally characterized proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 24, p. 9438–9441, 2012.
- KURCINSKI, M. et al. CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W419–W424, 2015.
- KURCINSKI, M. et al. Flexible docking of peptides to proteins using CABS-dock. **Protein Science**, v. 29, n. 1, p. 211–222, 2020.

- LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, n. 1, p. 2, 2006.
- LARSEN, M. V et al. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. **BMC bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 424, 2007.
- LASKAY, T. et al. Detection of cutaneous Leishmania infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 273–275, 1995.
- LEE, H. et al. GalaxyPepDock: a protein–peptide docking tool based on interaction similarity and energy optimization. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W431–W435, 2015.
- LEMKUL, J. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, p. 5068, 2019.
- LIRA, R. A. et al. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 11–16, 2006.
- LIU, R. et al. Early Diagnosis of Complex Diseases by Molecular Biomarkers, Network Biomarkers, and Dynamical Network Biomarkers. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 3, p. 455–478, 2014.
- LONDON, N.; RAVEH, B.; SCHUELER-FURMAN, O. Druggable protein-protein interactions - from hot spots to hot segments. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 6, p. 952–959, 2013.
- LOPES, E. G. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: One out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 12, p. 2436–2444, 2017.
- LOPEZ, C. F. et al. Hydrogen Bonding Structure and Dynamics of Water at the Dimyristoylphosphatidylcholine Lipid Bilayer Surface from a Molecular Dynamics Simulation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 21, p. 6603–6610, 004.
- LOVELL, S. C. et al. Structure validation by C α geometry: ϕ, ψ and C β deviation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 50, n. 3, p. 437–450, 8 jan. 2003.
- MAGALHÃES, F. B. et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, 2017.
- MARSDEN, R. L. Comprehensive genome analysis of 203 genomes provides structural genomics with new insights into protein family space. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 3, p. 1066–1080, 2006.
- MAXWELL, M. J. et al. Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani. **Genome Biology**, v. 9, n. 2, 2008.
- MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. **Nature**, v. 267, n. 5612, p. 585–590, 1977.
- MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of Leishmania. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p. 543–561, 2011.

- MERCADO-CAMARGO, J. et al. Homology Modeling of Leishmanolysin (gp63) from *Leishmania panamensis* and Molecular Docking of Flavonoids. **ACS Omega**, v. 5, n. 24, p. 14741–14749, 2020.
- MESHAM, R. J. et al. Modeling and simulation study to identify threonine synthase as possible drug target in *Leishmania major*. **Molecular Diversity**, n. 0123456789, 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**, 2006.
- MOAZZEZY, N. et al. Computational evaluation of modified peptides from human neutrophil peptide 1 (HNP-1). **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2020.
- MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 245–252, 2007.
- MUÑOZ, C. et al. Role of the ubiquitin-proteasome systems in the biology and virulence of protozoan parasites. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- MUNTEANU, C. R. et al. Improvement of epitope prediction using peptide sequence descriptors and machine learning. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.
- MURPHY, K. P. **Protein Structure, Stability, and Folding**. New Jersey: Humana Press, v. 168, 2001.
- NOYA, O. et al. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 4, p. 299–308, 2003.
- ORENGO, C. A.; TODD, A. E.; THORNTON, J. M. From protein structure to function. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 3, p. 374–382, 1999.
- OSTOLIN, T. L. V. D. P. et al. A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 39, n. 20, p. 2755–2763, 2021.
- PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.
- PÁLL, S. et al. Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. **Springer**, v. 8759 p. 3–27, 2015.
- PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184–1191, 2010.
- PARKER, J. M. R.; GUO, D.; HODGES, R. S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, v. 25, n. 19, p. 5425–5432, 1986.
- PATRA, P. et al. Biocomputational Analysis and In Silico Characterization of an Angiogenic Protein (RNase5) in Zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 4, p. 1687–1697, 2019.
- PENG, J.; XU, J. Raptorx: Exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 79, n. S10, p. 161–171, 2011.
- PESSOA-E-SILVA, R. et al. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old

- problems. **Experimental Parasitology**, v. 199, n. November 2018, p. 9–16, 2019.
- POOSARLA, V. G. et al. Computational de novo design of antibodies binding to a peptide with high affinity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 6, p. 1331–1342, 2017.
- RAVEH, B. et al. Rosetta FlexPepDockab-initio: Simultaneous folding, docking and refinement of peptides onto their receptors. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.
- REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 2, p. 303–311, 2006.
- REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 2009.
- RESENDE, D. M. et al. An assessment on epitope prediction methods for protozoa genomes. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, 2012.
- SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 40–48, 2006.
- 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**, v. 224, n. 1, p. 163–171, 2019.
- SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The Structural Basis of Antibody-Antigen Recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.
- SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003.
- SHAW, D. E. et al. Anton, a special-purpose machine for molecular dynamics simulation. **Communications of the ACM**, v. 51, n. 7, p. 91–97, 2008.
- SILVA, E. S. et al. Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 4, p. 1–5, 2005.
- SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 17, n. 4, p. 355–362, 1993.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706–717, 2017.
- SOLOMON, M. et al. Mucosal Leishmaniasis in Travelers with *Leishmania braziliensis* Complex Returning to Israel. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 4, p. 642–648, abr. 2019.
- SUNDAR, S.; SINGH, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis and Therapy**, v. 22, n. 4, p. 443–457, 2018.
- SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree

- of life. **Nucleic acids research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.
- TAI, K. et al. Mechanism of Acetylcholinesterase Inhibition by Fasciculin: A 5-ns Molecular Dynamics Simulation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 21, p. 6153–6161, 2002.
- TANG, L. et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding four different canine immunoglobulin γ chains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 80, n. 3–4, p. 259–270, 2001.
- TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2018.
- TRONCARELLI, M. Z. et al. Leishmania spp. and/or Trypanosoma cruzi diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 118–123, 2009.
- VANDERWEELE, T. J.; DING, P. Sensitivity Analysis in Observational Research: Introducing the E-Value. **Annals of Internal Medicine**, v. 167, n. 4, p. 268, 2017.
- VOLPINI, Â. C. et al. PCR-RFLP to identify Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (Leishmania) amazonensis causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 31–37, 2004.
- VON HEIJNE, G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 11, p. 4683–4690, 1986.
- WANG, X. et al. Evaluation and Comparison of Newly Built Linear B-Cell Epitope Prediction Software from a Users' Perspective. **Current Bioinformatics**, v. 13, n. 2, p. 149–156, 2018.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 407–410, 2007.
- WILLIAMS, T.; KELLEY, C. **GNUplot: an interactive plotting program**. [s.l: s.n.], 1998.
- XU, J.; WANG, S. Analysis of distance-based protein structure prediction by deep learning in CASP13. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 87, n. 12, p. 1069–1081, 2019.
- ZHANG, J. Studies on the structural stability of rabbit prion probed by molecular dynamics simulations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 27, n. 2, p. 159–162, 2009.
- ZHAO, H.; YANG, Y.; ZHOU, Y. Highly accurate and high-resolution function prediction of RNA binding proteins by fold recognition and binding affinity prediction. **RNA Biology**, v. 8, n. 6, p. 988–996, 2011.

9. ANEXO 1

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Campus Universitário - Monte do Cruzeiro
38400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3589-1388 Fax: (31) 3589-1173



OFÍCIO CEP Nº 032/2007, de 28 de março de 2007

Ilmº. Sr.

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis
NIUPB/CEB

Senhor Professor,

É com prazer que comunicamos a **aprovação**, por este Comitê, de seu **Projeto nº 2007/83** – “Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania* *Leishmania chagasi* e identificação de biomarcadores de progressão clínica” e aproveitamos para sugerir que seja incluído um termo de consentimento para que o dono do cão pesquisado assinasse.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Carlos Crocco Afonso
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/UFOP

