

RYAN EMILIANO DA SILVA

**Avaliação da Imunogenicidade de peptídeos derivados de
Catepsina L-like de *Leishmania infantum* em modelo murino**

São Paulo

2022

RYAN EMILIANO DA SILVA

**Avaliação da Imunogenicidade de peptídeos derivados de
Catepsina L-like de *Leishmania infantum* em modelo murino**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Arlei Marcili

São Paulo

2022

RESUMO

SILVA, R. E. **Avaliação da Imunogenicidade de peptídeos derivados de Catepsina L-like de *Leishmania infantum* em modelo murino.** 2022. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

As espécies do gênero *Leishmania* parasitam mamíferos em todo o mundo e possuem ciclos de vida com alternância entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo que a *Leishmania infantum* é o agente etiológico da manifestação visceral da leishmaniose. Parte da elevada patogenicidade do protozoário se justifica pela ação catalítica de catepsina L-like, uma cisteíno-protease que participa de uma variedade de processos metabólicos e regulatórios, além de importante mediação nos processos de patogênia e virulência, dentre os quais se destacam a evasão da resposta imune do hospedeiro, diferenciação celular, colonização e invasão de células, transposição de barreiras teciduais, degradação de proteínas hematopoiéticas, ativação de respostas inflamatórias e morte celular programada. Assim, este projeto teve como objetivo metodológico a caracterização *in silico* de catepsina L-like nos isolados brasileiros de *L. infantum*, bem como a proposição de fragmentos peptídicos conjugados a carreadores proteicos para imunização de modelos murinos, de modo a avaliar parâmetros de inocuidade e imunogenicidade. As sequências gênicas de catepsina L-like não demonstraram variabilidade intraespecífica, o que se refletiu na proposição de sequências proteicas de caráter consensual. A sequência primária de 354 resíduos demonstrou possuir um pI teórico de 6,69, a presença de três sítios catalíticos, e um caráter hidrofílico e termoestável. A sequência terciária demonstrou a presença de dois domínios proteicos, intercalados por uma região livre com ausência de motivos conhecidos. Com base nestas variáveis bioquímicas e estruturais, se elegeu uma sequência de 12 aminoácidos que correspondeu ao peptídeo 01. Este sofreu uma adição terminal de cisteína acoplada ao carreador Blue carrier protein, de modo a corresponder ao peptídeo 02. Quando estes peptídeos foram utilizados para imunizar camundongos isogênicos BALB/c, não se observou nenhuma resposta colateral, o que atestou a inocuidade dos peptídeos. As amostras séricas dos animais imunizados com estes segmentos peptídicos não demonstraram

reatividade nos ensaios de imunofluorescência. Contudo, quando as amostras séricas foram testadas através de ensaios imunoenzimáticos, foi observado um crescimento no valor de absorbância encontrado no grupo imunizado com o peptídeo 01 em relação aos animais imunizados com PBS, o que sugere um eventual potencial imunorreativo deste segmento. Assim, o estudo conclui que estes peptídeos derivados de catepsina L-like de *L. infantum* demonstram razoável potencial imunogênico, propondo a combinação futura com outras moléculas adjuvantes, de modo a atingir formulações que eventualmente potencializem o caráter imunoestimulante desta molécula. Desse modo, o trabalho contribui com a consolidação de uma metodologia de investigação *in silico* de segmentos com potencial imunogênico. Além disso, fornece um embasamento para iniciativas posteriores que se disponham a melhorar o perfil de imunorreatividade, voltado tanto para prospecção de substratos antigênicos para padronização de metodologias sorológicas com acurácia diagnóstica, quanto para ensaios de rastreio de antígenos vacinais.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Cisteíno-proteases. Peptídeos sintéticos. Bioinformática. Inovação tecnológica.

ABSTRACT

SILVA, R. E. **Evaluation of the immunogenicity of peptides derived from Cathepsin L-like from *Leishmania infantum* in murine model.** 2022. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Species of genus *Leishmania* parasitize mammals all over the world and have life cycles with alternation between vertebrate and invertebrate hosts, being that *Leishmania infantum* is the etiological agent of the visceral manifestation of leishmaniasis. Part of the high pathogenicity of the protozoan is justified by the catalytic action of cathepsin L-like, a cysteine protease that participates in a variety of metabolic and regulatory processes, as well as important mediation in pathogenic and virulence processes, which include: the evasion of the host's immune response, cell differentiation, cell colonization and invasion, transposition of tissue barriers, degradation of hematopoietic proteins, activation of inflammatory responses and programmed cell death. Thus, the objective of this project is to characterize in silico L-like cathepsin in Brazilian isolates of *L. infantum* and propose peptide fragments conjugated to protein carriers for immunization of murine models, in order to evaluate parameters of innocuity and immunogenicity. The L-like cathepsin gene sequences did not show intraspecific variability, which was reflected in the proposition of protein sequences of consensual character. The primary sequence of 354 residues have had a theoretical pI of 6.69, the presence of three catalytic sites was found in there, and a hydrophilic and thermostable character was observed. The tertiary sequence demonstrated the presence of two protein domains interspersed by a free region with the absence of known motifs. Based on these biochemical and structural variables, a sequence of 12 amino acids was chosen that corresponded to peptide 01. It underwent a terminal addition of cysteine coupled to the Blue carrier protein carrier, in order to correspond to peptide 02. When these peptides were inoculated to immunize isogenic BALB/c mice, no collateral response was observed, which attested the innocuity of the peptides. Serum samples from mice immunized with these peptide segments did not show reactivity in immunofluorescence assays. However, when the serum samples were tested through enzyme immunoassays, an increase in the absorbance value found in the group immunized with peptide 01 in relation to

the animals immunized with PBS was observed, which suggests an eventual immunoreactive potential of this segment. Thus, this study concludes that these peptides derived from L-like cathepsin from *L. infantum* demonstrate an immunogenic potential, suggesting future combination with other adjuvant molecules to reach formulations that eventually maximize the immunostimulatory character of this molecule. In this way, this work contributes to the consolidation of a methodology for in silico investigation of segments with immunogenic potential. In addition, it provides a basis for further initiatives that aim to improve the immunoreactivity profile to the prospecting antigenic substrates for standardizing serological methodologies with diagnostic accuracy and to the screening assays for vaccine antigens.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Cysteine proteases. Synthetic peptides. Bioinformatics. Technological innovation.