



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



GABRIELLA DE SOUZA FRAGOSO

**Avaliação de um peptídeo sintético de *Leishmania infantum*  
selecionado por imunoinformática para o diagnóstico sorológico  
da leishmaniose visceral canina**

Ouro Preto

2026

Gabriella de Souza Fragoso

**Avaliação de um peptídeo sintético de *Leishmania infantum*  
selecionado por imunoinformática para o diagnóstico sorológico  
da leishmaniose visceral canina**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares

Coorientadora: Francielle Bruna Rodrigues

Ouro Preto  
2026

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

F811a Fragoso, Gabriella de Souza.  
Avaliação de um peptídeo sintético de *Leishmania infantum* selecionado por imunoinformática para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. [manuscrito] / Gabriella de Souza Fragoso. - 2026.  
33 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares.  
Coorientadora: Ma. Francielle Bruna Rodrigues.  
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Leishmaniose visceral. 2. Testes Sorológicos. 3. Imunoinformática. 4. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. I. Soares, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar. II. Rodrigues, Francielle Bruna. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - CRB6/2322



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriella de Souza Fragoso

Avaliação de um peptídeo sintético de *Leishmania infantum* selecionado por imunoinformática para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de farmacêutico.

Aprovada em 06 de março de 2026

### Membros da banca

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Francielle Bruna Rodrigues - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dr. Fernando Augusto Siqueira Mathias - Universidade Federal de Ouro Preto

Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 04/05/2026



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares**, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR, em 04/05/2026, às 13:25, 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](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1101333** e o código CRC **0721ED69**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, fonte de força e luz em todos os momentos da minha caminhada. Foi pela fé e pela certeza de que nunca estive sozinha que consegui superar os desafios e chegar até aqui.

Aos meus pais, Ana Lucia de Souza e Reginaldo Cizlio Fragoso, deixo meu mais profundo e sincero agradecimento. Obrigada por todo amor, apoio, incentivo e por acreditarem em mim mesmo nos momentos em que eu duvidei. Cada conquista minha é também de vocês. Sou eternamente grata por todo esforço e dedicação para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Agradeço ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP) da Universidade Federal de Ouro Preto pela oportunidade de aprendizado, crescimento científico e desenvolvimento profissional. Cada experiência vivida no laboratório contribuiu de forma essencial para a construção deste trabalho e para minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, agradeço pela orientação, paciência, confiança e pelos ensinamentos transmitidos ao longo deste percurso. Sua dedicação e compromisso com a ciência foram fundamentais para a realização deste trabalho. À minha coorientadora, Francielle, meu muito obrigada pelo apoio, disponibilidade e contribuição em cada etapa do desenvolvimento deste estudo.

À minha república Tititi e a todas as amigas com quem tive o privilégio de conviver, agradeço pelos momentos compartilhados, pelo companheirismo, pelas risadas e pelo apoio nos dias difíceis. Vocês tornaram essa jornada mais leve e inesquecível.

Aos meus amigos Giulia e Lucas, que tive a alegria de conhecer durante o estágio na Pharlab, obrigada pela amizade, parceria e por dividirem comigo aprendizados e experiências tão importantes para minha trajetória.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) por todos os ensinamentos, oportunidades e vivências que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal. Levo comigo não apenas o conhecimento adquirido, mas também as memórias e os valores construídos ao longo dessa caminhada.

Meu sincero agradecimento a todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa conquista.

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença zoonótica e potencialmente fatal quando não tratada. Uma das dificuldades encontradas pelos órgãos de saúde é o seu rápido diagnóstico para decidir o tratamento correto. Assim como para a doença humana, no Brasil, o combate à Leishmaniose Visceral Canina (LVC) também enfrenta diversos desafios, especialmente em áreas endêmicas, onde os cães são os principais reservatórios urbanos, ampliando o ciclo de transmissão. Na LVC, o RTDPP e o EIE-LVC, que usam rK28 e antígeno bruto, são os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde. Contudo, estes apresentam reatividade cruzada e baixa sensibilidade em casos de imunossupressão ou baixa produção de anticorpos, comprometem a acurácia diagnóstica. Logo, há necessidade do desenvolvimento de novos antígenos e testes diagnósticos para LV. Neste contexto, o presente estudo avaliou especificamente o desempenho do peptídeo 47, selecionado por estratégias de imunoinformática, como alternativa ao diagnóstico sorológico convencional da LVC. A seleção e a análise do peptídeo foram realizadas com base em um banco de dados relacional, considerando escores gerados por algoritmos de predição de epítomos de células B. Também foram examinadas as funções biológicas da proteína de origem do peptídeo por meio de análises de redes de interação proteína-proteína, bem como estudos de similaridade e dinâmica molecular. A avaliação experimental foi conduzida por ensaio imunoenzimático, utilizando um conjunto de 160 amostras de soro, composto por cães infectados por *Leishmania infantum* com diferentes manifestações clínicas e por animais não infectados. Além disso, incluíram-se amostras de cães com outras infecções, como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Os resultados demonstraram elevada acurácia do peptídeo 47, com sensibilidade de 85% e especificidade 100%. Destaca-se que o peptídeo 47 apresentou desempenho superior no reconhecimento de amostras verdadeiramente negativas, não registrando resultados falso-positivos entre os soros negativos analisados. Também foi observada baixa reatividade cruzada em amostras de cães infectados por *T. cruzi*. Nossos resultados evidenciam a robustez da abordagem de bioinformática como estratégia promissora para o aprimoramento e seleção de alvos antigênicos para o diagnóstico da LVC.

**Palavras-Chave:** Leishmaniose Visceral Canina; Diagnóstico Sorológico; ELISA; imunoinformática; peptídeos.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic and potentially fatal disease when left untreated. One of the difficulties faced by health authorities is its rapid diagnosis in order to decide on the correct treatment. As with the human disease, in Brazil, the fight against canine visceral leishmaniasis (CVL) also faces several challenges, especially in endemic areas where dogs are the main urban reservoirs, expanding the transmission cycle. In CVL, RTDPP and EIE-LVC, which use rK28 and crude antigen, are the serological tests recommended by the Ministry of Health. However, these tests exhibit cross-reactivity and low sensitivity in cases of immunosuppression or low antibody production, compromising diagnostic accuracy. Therefore, there is a need for the development of new antigens and diagnostic tests for VL. In this context, the present study specifically evaluated the performance of peptide 47, selected by immunoinformatics strategies, as an alternative to the conventional serological diagnosis of CVL. The selection and analysis of the peptide were performed based on a relational database, considering scores generated by B-cell epitope prediction algorithms. The biological functions of the peptide's source protein were also examined through protein-protein interaction network analyses, as well as similarity and molecular dynamics studies. The experimental evaluation was conducted by enzyme immunoassay, using a set of 160 serum samples, composed of dogs infected with *Leishmania infantum* with different clinical manifestations and uninfected animals. In addition, samples from dogs with other infections, such as *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Leishmania braziliensis*, and *Trypanosoma cruzi*, were included. The results demonstrated high accuracy of peptide 47, with a sensitivity of 85% and specificity of 100%. Notably, peptide 47 showed superior performance in recognizing truly negative samples, not registering false-positive results among the negative sera analyzed. Low cross-reactivity was also observed in samples from dogs infected with *T. cruzi*. Our results highlight the robustness of the bioinformatics approach as a promising strategy for improving and selecting antigenic targets for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis.

**Keywords:** Canine Visceral Leishmaniasis; Serological Diagnosis; ELISA; Immunoinformatics; Peptides.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de sinal clínico caracterizado por onicogrifose.....	13
Figura 2 – Representação de sinais clínicos caracterizados por descamação, queda de pelos e feridas na pele. ....	13
Figura 3 – Representação de sinais clínicos caracterizados por ceratoconjuntivite, emagrecimento e apatia. ....	14
Figura 4 – Desenho experimental aplicado no teste sorológico para o peptídeo 47 e Mix .....	19
Figura 5– Padronização das melhores condições reacionárias do ensaio imunoenzimático (ELISA) para o peptídeo 47.....	23
Figura 6 – Performance do peptídeo 47 na detecção de cães não infectados e infectados por <i>L. infantum</i> .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Grau Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

anti-LVC – Anti-Leishmaniose Visceral Canina

Bc – *Babesia canis*

BLASTp – *Basic Local Alignment Search Tool for proteins* (Ferramenta básica de alinhamento local para proteínas)

BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina sérica bovina)

CA – Cães Assintomáticos

CABSdock – CABS-dock (ferramenta de atracagem molecular para peptídeo-proteína)

CCA – Centro de Ciência Animal

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CNA – Controle Negativo de Área Endêmica

CNC – Controle Negativo de Canil

CO – Cães Oligossintomáticos

CRC – Controle de Reatividade Cruzada

CS – Cães Sintomáticos

DO – Densidade Óptica

Ec – *Ehrlichia canis*

EIE® – Ensaio Imunoenzimático

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

GROMACS – *GROningen MACHine for Chemical Simulations* (Programa para simulações de dinâmica molecular)

IgG – Imunoglobulina G

Lb – *Leishmania braziliensis*

LIMP – Laboratório de Immunopatologia

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

MS – Ministério da Saúde

NI - Cães não infectados

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salino)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH – Potencial hidrogeniônico

PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PoC – *Point of Care* (Teste realizado no local de atendimento)

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RT DPP® – *Rapid Test Dual Path Platform* (Teste rápido de plataforma de duplo percurso)

Tc – *Trypanosoma cruzi*

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

WHO – *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina .....	14
1.1.1 Diagnóstico Sorológico .....	14
1.2.2 Diagnóstico Parasitológico .....	16
1.2.3 Medidas preventivas e de controle da Leishmaniose Visceral Canina .....	16
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
3.1 Amostras biológicas de soro canino .....	19
3.2 Obtenção e caracterização do peptídeo sintético .....	20
3.3 Peptídeo selecionado por imunoinformática .....	21
3.4 Ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) .....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
4.1 Padronização do ensaio imunoenzimático empregando o peptídeo 47 .....	22
4.2 Detecção de cães infectados por <i>L. infantum</i> em amostras de soro empregando o peptídeo 47 pelo ensaio imunoenzimático.....	23
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença infecciosa crônica, causada por protozoários do gênero *Leishmania* que integra o grupo de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017). No Brasil, o cão tem um papel importante na disseminação da Leishmaniose Visceral (LV), por apresentar alto parasitismo cutâneo, atuando como fonte de infecção para insetos vetores, o que torna esses animais os principais reservatórios da doença no ciclo urbano. Estudos apontam que a elevada taxa de infecção nos cães está relacionada com maior risco de doença humana (NUNES *et al.*, 2010; BELO *et al.*, 2013; COURA-VITAL *et al.*, 2013).

As ações de controle adotadas, até o momento, estavam organizadas de forma verticalizada, com foco principal no manejo do reservatório canino, por meio de inquéritos sorológicos e eutanásia de cães soropositivos, além da utilização de inseticidas, do diagnóstico e do tratamento adequado dos casos notificados. Contudo, a execução dessas medidas, frequentemente de maneira isolada, não demonstrou impacto significativo na redução da incidência da enfermidade, evidenciando a necessidade de revisão das estratégias estabelecidas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Considerando as dificuldades relacionadas ao controle da doença, a estratégia proposta para a vigilância e implementação das medidas fundamenta-se em uma definição mais precisa das áreas com transmissão ou sob risco. Essa nova abordagem inclui a inserção de estados e municípios classificados como silenciosos, isto é, sem registro de casos humanos ou caninos, nas ações de vigilância, com o objetivo de prevenir ou reduzir problemas associados ao agravo em locais sem transmissão. Já nas áreas onde há ocorrência de LV, após a estratificação epidemiológica, as intervenções de controle devem ser diferenciadas e ajustadas às características de cada local. Ainda assim, é essencial que as medidas tradicionalmente utilizadas no enfrentamento da doença sejam executadas de forma integrada, a fim de garantir maior efetividade (Ministério da saúde, 2022).

A realização da eutanásia em cães positivos para LVC é um dos pontos chave que vem sendo discutidos em vários estudos. Pesquisadores buscam alternativas para o controle, apresentando possibilidades de tratamentos e vacinas anti-LVC com o intuito de diminuir a expansão da doença (RIBEIRO *et al.*, 2018). As medidas propostas ainda não obtiveram sucesso, dessa forma devem ser acompanhadas com cautela para que sejam aplicadas de modo seguro e rigoroso nas ações de saúde pública. Além disso, tem sido pesquisado em diversos trabalhos alternativas ao diagnóstico da LVC visando garantir a precisão na identificação de animais infectados. Em razão da recomendação do Ministério da Saúde (MS) em relação à eliminação de animais infectados, é extremamente importante o desenvolvimento de técnicas diagnósticas confiáveis para evitar a eutanásia de animais falso-positivos ou a manutenção de cães falso-negativos no ciclo urbano (SOUSA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2020).

No Brasil, o exame imunológico para o diagnóstico da LV humana (LVH) que foi mais empregado é a imunofluorescência indireta (RIFI), além dos ensaios imunoenzimáticos. Na RIFI, os resultados são expressos em diluições, sendo consideradas positivas aquelas iguais ou superiores a 1:80. Para títulos de 1:40, recomenda-se a coleta de uma nova amostra após 30 dias. Já o teste ELISA apresenta resultados em unidades de absorbância, obtidas a partir da

leitura da reação com diluições fixas, sendo mais frequentemente classificado apenas como reagente ou não reagente. Quando associados a achados clínicos e laboratoriais, resultados sorológicos reagentes contribuem para o diagnóstico da LVH. Entretanto, na ausência de manifestações clínicas sugestivas, a positividade isolada não indica o início do tratamento humano (Ministério da Saúde, 2022).

Na LVC os testes diagnósticos fornecidos pelo MS apresentam diversas dificuldades descritas na literatura, entre elas se destacam reações cruzadas com outros patógenos caninos, baixa sensibilidade na detecção de cães assintomáticos, ocorrência de resultados falso-positivos em animais vacinados (GRIMALDI *et al.*, 2012; MARCONDES *et al.*, 2013). Uma das alternativas propostas é aprimorar o diagnóstico da LVC, uma vez que é necessário fornecer testes sorológicos de confiança na detecção de cães de diferentes formas clínicas, vacinados e com outras patologias, com a finalidade de propiciar melhores ações de controle da doença.

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com bioinformática na busca de seleção de potenciais alvos antigênicos para o desenvolvimento de vacinas bem como para o diagnóstico da LVC. 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 às 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 à medida em que novas moléculas, interações e mecanismos eram descobertos, dando origem a bioinformática (BALDI *et al.*, 2001). 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.

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 imunoenaios, dentre estes destacam-se os peptídeos sintéticos (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 e colaboradores (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.*, 2017; 2019).

Assim, a partir do banco de dados relacional, elaborado previamente por Maia (2021), nosso grupo de pesquisa 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 como complemento para a seleção desses epítomos. Em vista disso, a partir dos

resultados preliminares obtidos por Maia (2021), avaliamos nesse estudo o peptídeo 47 em um conjunto heterogêneo de amostras de soro canino. Assim, foi possível avaliar o desempenho deste peptídeo sintético na detecção da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em amostras de cães, incluindo animais infectados, não infectados, com outras infecções e também vacinados. Nosso intuito foi verificar se peptídeos sintéticos podem se tornar uma alternativa ao diagnóstico da LVC na população canina e, conseqüentemente, fortalecer o papel da imunoinformática na seleção racional e otimizada de novos alvos antigênicos. Dessa forma, busca-se contribuir para o desenvolvimento de novos ensaios sorológicos voltados ao diagnóstico em cães, permitindo a detecção precisa e precoce da infecção e favorecendo a implementação de intervenções sanitárias mais eficazes, com o objetivo de minimizar os impactos sociais da leishmaniose visceral.

### **Leishmaniose Visceral Canina**

A LVC é uma doença infecciosa de origem parasitária que acomete cães domésticos e possui grande relevância no contexto da saúde pública, por sua estreita relação com a LVH. A enfermidade é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, principalmente pela espécie *Leishmania infantum*, e apresenta caráter zoonótico. Em regiões endêmicas, o cão é reconhecido como o principal reservatório urbano do parasito, desempenhando papel central na manutenção e disseminação do ciclo de transmissão (DANTAS-TORRES, 2024).

A transmissão da LV ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas da subfamília *Phlebotominae*, principalmente pelas espécies *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*. popularmente conhecidos como mosquitos-palha. Durante o processo de alimentação hematofágica, o vetor pode adquirir o parasito ao se alimentar de um cão infectado e, posteriormente, transmiti-lo a outros animais ou ao ser humano. Esse mecanismo torna a presença de cães infectados um fator determinante para a persistência da doença em áreas urbanas, especialmente em locais com condições ambientais e socioeconômicas favoráveis à proliferação do vetor (WHO, 2023; DANTAS-TORRES, 2007; BRASIL, 2023).

A infecção por *L. infantum* nos cães pode resultar em uma ampla variedade de manifestações clínicas, que variam desde quadros assintomáticos até formas graves e potencialmente fatais. Muitos cães infectados não apresentam sinais clínicos evidentes, porém mantêm elevada carga parasitária, especialmente na pele, o que os torna fontes importantes de infecção para os flebotomíneos. Essa característica dificulta o controle da doença, uma vez que animais aparentemente saudáveis podem contribuir silenciosamente para a transmissão do parasito (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; LAURENTI *et al.*, 2013; QUINNELL; COURTENAY, 2009).

A infecção por *Leishmania* pode comprometer diferentes tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos e eosinófilos. Essa ampla capacidade de interação celular permite que o parasito alcance praticamente todos os tecidos e órgãos do organismo, incluindo o sistema nervoso central (SARIDOMICHELAKIS, 2009). A diversidade de manifestações clínicas está relacionada à resposta imunológica do hospedeiro, à carga parasitária e à evolução da infecção, o que torna o diagnóstico clínico isolado insuficiente para a confirmação da doença.

Durante muitos anos, os cães acometidos pela LVC foram classificados clinicamente a partir dos achados obtidos no exame físico, sendo agrupados em três categorias: assintomáticos, quando não apresentavam sinais clínicos evidentes; oligossintomáticos, quando manifestavam até três sinais clínicos; e sintomáticos, quando exibiam mais de três manifestações clínicas típicas da doença (MANCIANTI *et al.*, 1996; REIS *et al.*, 2009). Contudo, esse modelo de classificação mostrou-se insuficiente, uma vez que não contemplava alterações clínico-patológicas em órgãos internos que podem ocorrer mesmo na ausência de sinais clínicos aparentes. Atualmente, a classificação dos cães baseia-se em um sistema de estadiamento clínico, fundamentado principalmente em resultados de sorologia quantitativa, em parâmetros laboratoriais relacionados à evolução da doença renal, na gravidade das lesões e em alterações analíticas observadas em cada caso (NOGUEIRA & RIBEIRO, 2015).

A apresentação clínica da LVC é heterogênea, podendo variar desde animais sem manifestações evidentes até quadros com múltiplos sinais clínicos. A maioria dos cães infectados permanece assintomática, o que dificulta o reconhecimento precoce da infecção e favorece a manutenção silenciosa do parasito no ambiente. Quando presentes, os sinais clínicos podem incluir comprometimento sistêmico associado à disfunção imunológica. Alterações dermatológicas são frequentes, com lesões cutâneas localizadas principalmente na região periorcular e no focinho, semelhantes às observadas na forma tegumentar da doença. Além disso, podem ocorrer manifestações oculares, como ceratoconjuntivite, alterações neuromusculares, envolvimento de órgãos internos, aumento de fígado e baço, apatia, emagrecimento progressivo e crescimento exagerado das unhas (FARIA & ANDRADE, 2012; CAMARGO *et al.*, 2007).

**Figura 1:** Onicogribose (Crescimento exarcebado das unhas)



Fonte: Prefeitura de Belo Horizonte, 2026.

**Figura 2:** Descamação, queda de pelos e feridas na pele.



Fonte: Prefeitura de Belo Horizonte, 2026.

**Figura 3:** Ceratoconjuntivite, emagrecimento e apatia



Fonte: Prefeitura de Belo Horizonte, 2026.

Diante desse cenário, a LVC configura-se como uma enfermidade de grande impacto sanitário, epidemiológico e social. A compreensão de seus aspectos gerais, incluindo etiologia, transmissão, epidemiologia, manifestações clínicas, diagnóstico e estratégias de controle, é essencial para o desenvolvimento de políticas públicas eficazes e para a redução da incidência da doença tanto na população canina quanto na humana, especialmente em áreas endêmicas (Ministério da Saúde, 2023).

## 1.1 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

O diagnóstico da LVC é considerado complexo devido à diversidade de manifestações clínicas, à existência de animais assintomáticos com elevada carga parasitária e às limitações inerentes aos métodos diagnósticos disponíveis. Dessa forma, a confirmação da infecção deve basear-se na associação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, sendo os métodos sorológicos e parasitológicos os mais amplamente utilizados na rotina clínica e nos programas oficiais de vigilância (FARIA, 2012).

### 1.1.1 Diagnóstico sorológico

Os métodos sorológicos têm como objetivo a detecção de anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro em resposta à infecção por *Leishmania*. Esses testes são amplamente empregados devido à sua praticidade, custo relativamente acessível e facilidade de aplicação em estudos populacionais. Entre os métodos sorológicos mais utilizados destacam-se o ensaio imunoenzimático (ELISA), a RIFI e os testes imunocromatográficos rápidos (FARIA, 2012).

Até o ano de 2012, o MS adotava a RIFI como teste de triagem e o ensaio imunoenzimático (ELISA) como método confirmatório no diagnóstico da LVC. Posteriormente, visando aprimorar a acurácia diagnóstica, o MS passou a indicar a utilização do teste rápido imunocromatográfico Dual-Path Platform® (Bio-Manguinhos®/Fiocruz). Esse ensaio baseia-se no uso de antígenos recombinantes rK26, rK9 e rK39, desenvolvidos por Bio-Manguinhos/Fiocruz, no Rio de Janeiro, para a identificação de cães infectados. Mesmo com a introdução desse teste, o ELISA permanece sendo utilizado em etapa subsequente para a

confirmação dos resultados reagentes (RIBEIRO *et al.*, 2019; PAZ *et al.*, 2018; PEIXOTO *et al.*, 2014).

O diagnóstico sorológico baseia-se na identificação de anticorpos circulantes da classe IgG direcionados contra o parasito *Leishmania*, produzidos no decorrer da resposta imune humoral do hospedeiro (GONTIJO & MELO, 2004; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007). Contudo, esses métodos apresentam limitações relacionadas, principalmente, ao momento em que o exame é realizado, podendo ocorrer resultados falso-negativos em cães avaliados durante o período pré-patente ou antes do processo de soroconversão. Adicionalmente, reações cruzadas com enfermidades provocadas por outros tripanossomatídeos podem levar à obtenção de resultados falso-positivos (ALVES & BEVILACQUA, 2004; GOMES *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2013). Em razão dessas limitações, observa-se que os testes sorológicos apresentam variações quanto à sensibilidade e à especificidade (GONTIJO & MELO, 2004).

Entre os métodos imunológicos atualmente empregados, a RIFI figura como um dos mais utilizados, tendo sido introduzida na década de 1960. Essa técnica utiliza o parasito íntegro como antígeno e apresenta aplicabilidade relevante em investigações epidemiológicas. No entanto, sua execução demanda profissionais com elevado nível de capacitação, além do uso de equipamentos específicos e de custo elevado. Ademais, a necessidade de realizar diluições seriadas das amostras de soro torna o procedimento trabalhoso, limitando sua utilização em processos de triagem que envolvem grande volume de amostras. A sensibilidade da RIFI varia entre 83% e 100%, enquanto sua especificidade é em torno de 80% quando aplicada a amostras séricas. Apesar disso, o método pode apresentar reações cruzadas com outras doenças, como Leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (GONTIJO & MELO, 2004; SOUZA *et al.*, 2013).

Já o ensaio imunoenzimático (ELISA) é amplamente empregado como método confirmatório no diagnóstico da LVC. Desenvolvida na década de 1970, essa técnica possibilita a análise de um elevado número de amostras em um curto intervalo de tempo. Ademais, o ELISA apresenta grande versatilidade, podendo ser adaptado para a utilização de diferentes tipos de antígenos, incluindo antígenos brutos, sintéticos ou recombinantes, o que permite inúmeras variações do método. Com a incorporação dessa técnica à rotina diagnóstica, exames que demandavam maior complexidade técnica, como a reação de fixação do complemento, deixaram de ser amplamente utilizados no diagnóstico da LV, direcionando os esforços científicos para o aprimoramento contínuo dos antígenos empregados nos ensaios de ELISA (GONTIJO & MELO, 2004; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007; MAIA & CAMPINO, 2008).

O teste ELISA destaca-se no diagnóstico sorológico da LVC por permitir a análise simultânea de um grande número de amostras, com resultados mais rápidos. Embora os antígenos brutos apresentem boa sensibilidade para a detecção da infecção, sua especificidade é geralmente menor, principalmente devido à ocorrência de reações cruzadas. Em contrapartida, a utilização de peptídeos recombinantes, como as proteínas rK9, rK26 e rK39, promove um aumento significativo tanto da sensibilidade quanto da especificidade da técnica. No Brasil, o diagnóstico confirmatório da LVC é atualmente realizado por meio do ensaio imunoenzimático

(EIE®) da Bio-Manguinhos®, que emprega antígenos brutos solúveis e purificados de *L. major*, obtidos a partir de cultivo *in vitro* e fixados em microplacas para a detecção de anticorpos em amostras de soro ou plasma de cães. Além disso, a partir da década de 1990, passaram a ser utilizadas técnicas cromatográficas no diagnóstico da doença, com o desenvolvimento dos testes imunocromatográficos rápidos, ou *Point of Care* (PoC), que utilizam principalmente os antígenos recombinantes rK26 e rK39. Entre esses testes, destaca-se o *Dual Path Platform* (RT DPP® – Bio-Manguinhos®), atualmente empregado pelo Ministério da Saúde no rastreamento canino, apresentando elevados índices de sensibilidade e especificidade e reforçando a importância dos antígenos recombinantes no diagnóstico e controle da LVC. (MOHAPATRA *et al.*, 2010)

### 1.1.2 Diagnóstico parasitológico

Os métodos parasitológicos baseados na punção de órgãos permitem a confirmação da infecção por possibilitarem a observação direta do parasito, porém caracterizam-se por serem procedimentos invasivos. Embora apresentem elevada especificidade, podendo atingir valores próximos a 100%, a sensibilidade desses métodos é variável, em razão da distribuição desigual do parasito nos tecidos (GONTIJO *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2020). As formas amastigotas podem ser identificadas em biópsias de pele, aspirados de linfonodos, medula óssea e baço, assim como em biópsias hepáticas, sendo o material coletado submetido à coloração por técnicas rotineiras (SILVA, 2007). Na prática clínica veterinária, os aspirados de medula óssea e de linfonodos são os mais frequentemente utilizados para o diagnóstico da LVC, embora possam ocorrer resultados falso-negativos, especialmente em cães assintomáticos, devido à baixa carga parasitária presente nas amostras (GOMES *et al.*, 2008).

A punção de medula óssea apresenta sensibilidade variável, geralmente entre 60% e 85%, enquanto o aspirado esplênico pode alcançar valores mais elevados, chegando a aproximadamente 98%. No entanto, esse último procedimento envolve maior risco ao animal, exigindo a realização por profissionais com experiência técnica (FARIA, 2012).

### 1.1.3 Medidas preventivas e de controle da Leishmaniose Visceral Canina

O diagnóstico precoce da LVC é fundamental para aumentar as chances de controle clínico da doença, reduzir a progressão das lesões e melhorar a qualidade de vida do animal. A identificação da infecção em fases iniciais permite a instituição rápida do tratamento, o monitoramento adequado do estado clínico e a adoção de medidas preventivas para diminuir a carga parasitária. Nesse contexto, o uso de coleiras impregnadas com inseticidas, como a deltametrina, também se destaca como uma importante estratégia complementar, pois atua na repelência e no controle do flebotômico vetor, reduzindo a probabilidade de transmissão da *Leishmania infantum*. Além disso, como o cão é o principal reservatório doméstico da *Leishmania infantum*, o diagnóstico precoce contribui para a redução do risco de transmissão ao flebotômico e, conseqüentemente, para a proteção da saúde pública (BRASIL, 2014).

O estudo do Coura-Vital *et al.* (2018) reforça a relevância das coleiras impregnadas com deltametrina como ferramenta eficaz no controle do vetor, quando associadas ao diagnóstico e tratamento de casos humanos e à eutanásia de cães soropositivos, compondo um conjunto

integrado de ações previstas no Programa Brasileiro de Controle e Vigilância da LV. A Nota Técnica Nº 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS preconiza a incorporação das coleiras impregnadas com deltametrina a 4% como uma ferramenta oficial de saúde pública para o controle da LV (BRASIL, 2021). Essa medida foi baseada em um estudo multicêntrico realizado em 14 municípios brasileiros, o qual demonstrou que o uso das coleiras, aliado às demais ações do programa, foi capaz de reduzir em 50% a prevalência da doença em cães nas áreas de intervenção (BRASIL, 2021). Werneck et al. (2024) observaram que o uso das coleiras impregnadas com deltametrina esteve associado a uma redução de 27% na incidência de LVH durante o período de implementação, indicando que essa estratégia é eficaz como medida adicional para o controle da LV no Brasil.

No contexto terapêutico da doença canina oa Milteforan™ (miltefosina 2%, Virbac Santé Animale, Carros, França) é o único fármaco com comprovação de segurança e eficácia para o tratamento da LVC (Brasil, 2016). Embora os protocolos da Brasileish reconheçam o uso de fármacos com embasamento científico, como o alopurinol e a domperidona, esses compostos apresentam mecanismos de ação distintos no manejo da leishmaniose visceral canina. O alopurinol atua como um leishmanostático, interferindo no metabolismo das purinas do parasito, o que reduz sua multiplicação no hospedeiro, sendo frequentemente utilizado em tratamentos de longo prazo para controle clínico da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; NOLI; SARIDOMICHELAKIS, 2014). Já a domperidona possui ação imunomoduladora indireta, promovendo o aumento da liberação de prolactina, o que pode estimular a resposta imune celular do tipo Th1, considerada importante no controle da infecção por *Leishmania infantum* (SABATÉ et al., 2014; LLANO et al., 2020).

Apesar dos benefícios observados, esses tratamentos não promovem a eliminação completa do parasito, podendo ocorrer recidivas clínicas após a interrupção da terapia. Dessa forma, seu uso está associado principalmente ao controle dos sinais clínicos e à redução da carga parasitária, sendo necessário acompanhamento contínuo dos animais tratados (LLANO et al., 2020). Em função disso, recomenda-se o monitoramento contínuo dos animais em intervalos de quatro a seis meses, utilizando exames sorológicos, parasitológicos e/ou moleculares, além de avaliações clínico-laboratoriais, com o objetivo de acompanhar a carga parasitária e adequar as condutas terapêuticas (Leishvet, 2018; RIBEIRO, 2016).

As limitações existentes no programa brasileiro de enfrentamento da LVC, sobretudo no que se refere à confiabilidade dos métodos diagnósticos, evidenciam a necessidade de novas abordagens para a identificação da infecção em cães. Nesse cenário, o presente estudo direciona-se à avaliação do desempenho de um peptídeo sintético, cuja capacidade diagnóstica foi investigada por meio da análise de amostras de soro provenientes de cães naturalmente infectados e não infectados, contemplando diferentes apresentações clínicas da doença, bem como a ocorrência de outras infecções caninas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o desempenho diagnóstico de um peptídeo sintético selecionado por imunoinformática no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral Canina.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Padronizar o ensaio imuno enzimático (ELISA) utilizando o peptídeo selecionado;
- Avaliar a capacidade do peptídeo em detectar anticorpos em cães com diferentes formas clínicas da LVC;
- Investigar a ocorrência de reatividade cruzada com outras infecções caninas;
- Determinar sensibilidade, especificidade e acurácia dos ensaios sorológicos com o peptídeo.

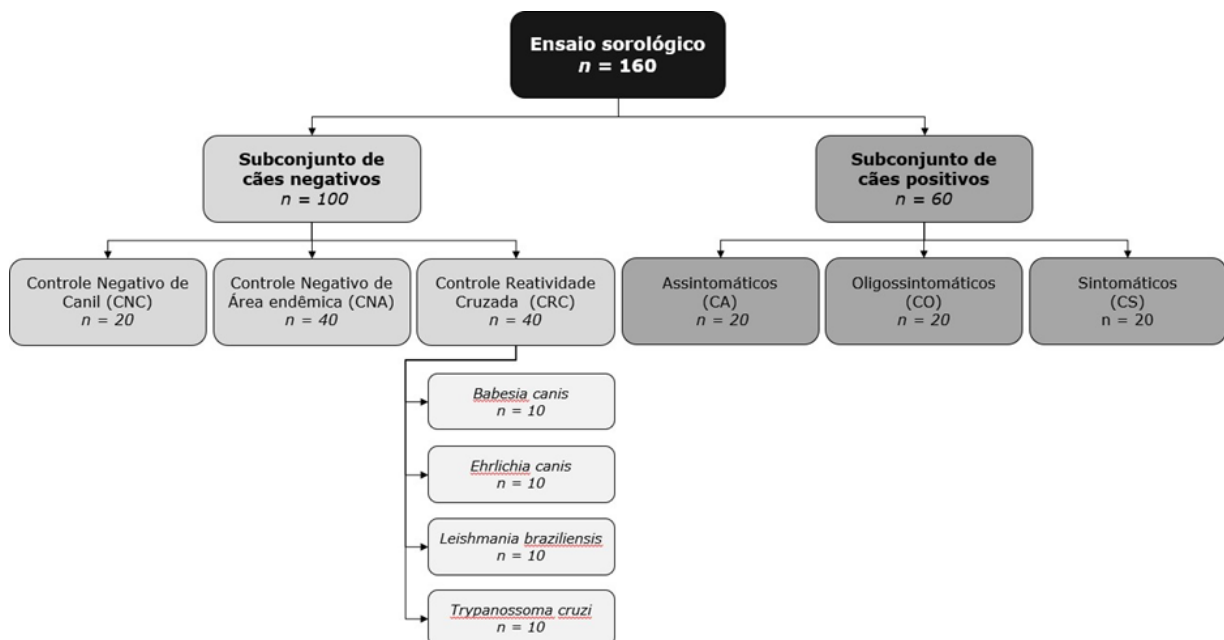
### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Amostras biológicas de soro canino

Foram analisadas 160 amostras de soro canino proveniente da soroteca caracterizada do Laboratório de Imunopatologia (LIMP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOP) sob número de protocolo 083/2007.

As amostras foram divididas em diferentes grupos de acordo com a Figura 4.

**Figura 4:** No subconjunto de cães negativos temos: o grupo denominado Controle Negativo de Canil (CNC) incluiu cães do canil de experimentação animal da UFOP; o grupo denominado Controle Negativo de Área Endêmica (CNA) representa os cães negativos da área endêmica para LV; o grupo denominado Controle de Reatividade Cruzada (CRC) engloba animais com infecções pelo *T. cruzi*, *L. braziliensis*, *E. canis* e *B. canis*. Os cães naturalmente infectados com *L. infantum* foram separados de acordo com seu status clínico, sendo categorizados como cães assintomáticos (CA), cães oligossintomáticos (CO) e cães sintomáticos (CS).



Fonte: Elaboração própria, 2024.

Foram utilizadas 100 amostras de soro, agrupadas como subconjunto de cães negativos para LV. Este subconjunto foi composto por 3 grupos distintos. O primeiro, denominado Controle Negativo de Canil (CNC), consistiu em amostras de soro de 20 cães sem infecção, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP, uma área não endêmica para LVC.

O segundo grupo, denominado Controle Negativo de Área Endêmica (CNA), foi formado por outras 40 amostras de soro de cães do município de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. Ambos os grupos foram caracterizados por resultados negativos sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* no soro, utilizando o teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform (RT DPP® – Bio-Manguinhos®). O terceiro grupo, Controle Reatividade Cruzada (CRC), incluiu amostras de cães infectados por *Ehrlichia canis* (n=10), *Babesia canis* (n=10), *Leishmania braziliensis* (n=10) e *Trypanosoma cruzi* (n=10), as quais foram incluídas no estudo para avaliar possíveis reações cruzadas. Todas as infecções foram previamente identificadas por meio de sorologia específica ELISA da Bio-Manguinhos e/ou PCR.

Dentro do subconjunto de cães positivos, foram incluídas amostras de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (n=60), divididos em três subgrupos com base no estado clínico. Os cães sem sinais clínicos visíveis foram designados como assintomáticos (CA; n=20). Aqueles com um a três sinais clínicos foram agrupados como oligossintomáticos (CO; n=20), enquanto os cães com mais de três sinais clínicos foram classificados como sintomáticos (CS; n=20). Os sinais clínicos considerados relevantes incluíram opacidade do pelo, perda de peso severa, onicogribose, lesões na pele, apatia e ceratoconjuntivite (REIS *et al.*, 2006). A confirmação da infecção foi baseada na sororreatividade dos testes RT DPP® – Bio-Manguinhos® e o ensaio imunoenzimático EIE® – Bio-Manguinhos®, conforme os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde no Brasil.

### **3.2 Obtenção e caracterização do peptídeo sintético**

O peptídeo denominado peptídeo 47 foi selecionado a partir de um banco de dados relacional previamente desenvolvido por Brito (2014), construído com base no proteoma predito de *Leishmania infantum*. Esse banco foi elaborado utilizando diferentes algoritmos de predição de epítopos de células B, incluindo ferramentas como BepiPred, AAP12 e BCPred12, associados a análises complementares, como predição de localização subcelular e propriedades físico-químicas das proteínas.

A seleção do peptídeo foi realizada considerando parâmetros relacionados à antigenicidade, exposição superficial e potencial de reconhecimento por anticorpos, priorizando sequências com maior probabilidade de induzir resposta imune humoral. Adicionalmente, foram consideradas análises de similaridade para minimizar possíveis reações cruzadas com proteínas de outros organismos.

A proteína de origem do peptídeo 47 foi identificada a partir do banco de dados utilizado, sendo posteriormente submetida a análises complementares, incluindo redes de interação proteína-proteína, com o objetivo de melhor compreender seu possível papel biológico.

O peptídeo selecionado foi sintetizado por meio de síntese química em fase sólida, utilizando a estratégia padrão baseada em química Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonila), amplamente empregada para obtenção de peptídeos sintéticos. Após a síntese, o peptídeo foi purificado e submetido a controle de qualidade, garantindo sua utilização em ensaios imunológicos.

### 3.3 Peptídeo selecionado por imunoinformática

Neste projeto, avaliamos um peptídeo selecionado por imunoinformática conforme pipeline construído por Maia (2021). Dessa forma, em trabalhos anteriores, os peptídeos foram selecionados e avaliados a partir de um banco de dados relacional, considerando critérios como: escores em algoritmos de predição de epítomos de células B (BepiPred, BCPred12 e AAP12), análise de similaridade por meio do BLASTp, além de estudos de atracagem molecular (CABSdock) e dinâmica molecular (GROMACS).

Adicionalmente, foi investigada a função biológica das proteínas de origem desses peptídeos, por meio de análises de redes de interação proteína-proteína, permitindo inferir seu possível envolvimento em processos celulares relevantes do parasito, como metabolismo, virulência, sobrevivência e interação com o hospedeiro.

A partir dessas abordagens, foram selecionados 10 peptídeos com potencial antigênico por meio de ferramentas de bioinformática, os quais foram posteriormente sintetizados pela empresa Genscript. No presente estudo, foi selecionado o peptídeo denominado 47 para avaliação de seu potencial no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina, utilizando a técnica de ELISA.

Ressalta-se que, devido a questões de confidencialidade relacionadas a pedido de patente ainda não depositado, a sequência do peptídeo não pôde ser divulgada.

### 3.4 Ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

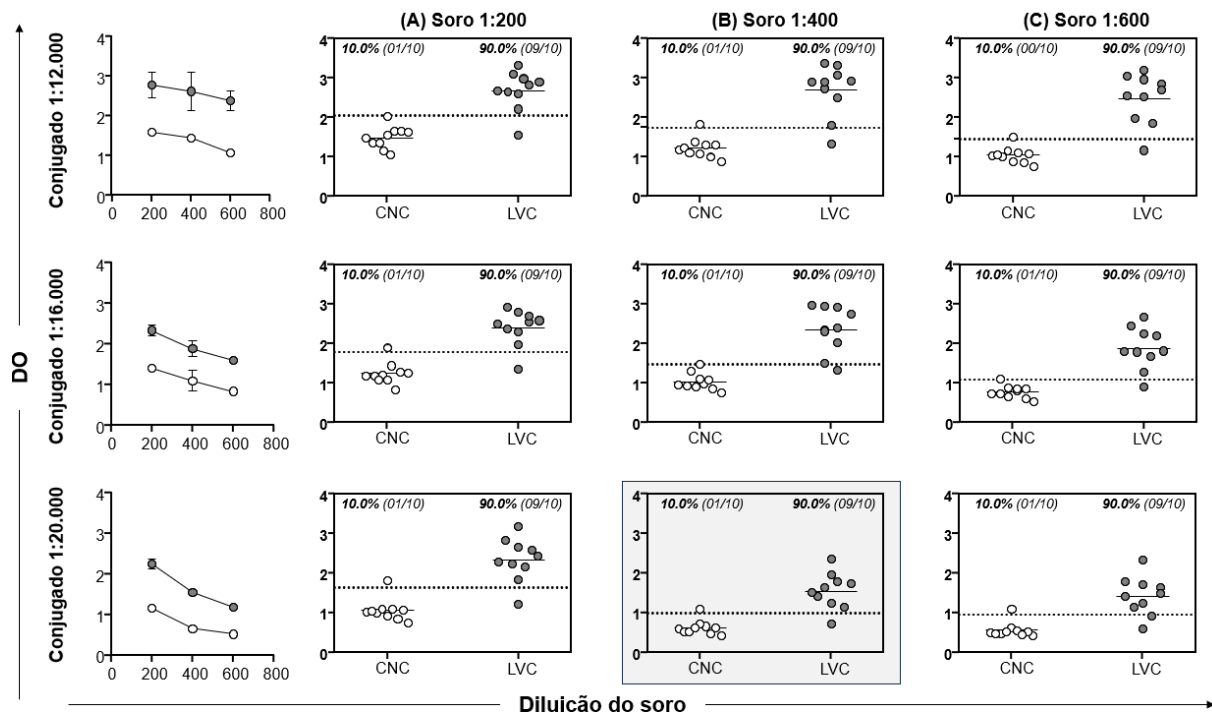
O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi conduzido inicialmente conforme protocolo descrito por (MOREIRA et al., 2024) e descrito sucintamente a seguir. Placas de poliestireno de fundo chato (Nunc MaxiSorp®) foram sensibilizadas com o peptídeo 47 (0,25µg/poço) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubados *overnight* a 4°C. Após incubação, o excesso de antígeno foi removido através de sucessivas lavagens com PBS (pH 7,4) contendo 0,05% de *Tween* 20. Os sítios livres dos poços foram bloqueados por 2 horas, utilizando solução de PBS com pH 7,2 contendo 0,05% *Tween* 20 e 5% de albumina sérica bovina (BSA). Após bloqueio, um novo processo de lavagem foi realizado. Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora a 37°C com as amostras de soros diluídas nas proporções de 1:200, 1:400 e 1:600. Logo após, foi adicionado aos poços o anticorpo conjugado IgG anti-cão (Goat anti-Dog IgG-h+I HRP Conjugated) nas seguintes diluições: 1:12.000 1:16.000 1:20.000; em seguida as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. A melhor diluição do soro bem como a melhor diluição do conjugado foi definida com base em resultados de padronização em 10 amostras de soro positivos e 10 negativos para LVC. Após lavagem dos poços, as reações foram finalizadas com a adição do substrato, 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina, as placas foram incubadas por 5 minutos, em seguida a reação foi interrompida com 32 µL de solução de 2,5M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e imediatamente realizada a leitura em espectrofotômetro (ELX800 Biotek Instruments VT, USA) à 450 nm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Padronização do ensaio imunoenzimático empregando o peptídeo 47

O peptídeo 47 foi padronizado utilizando amostras de soro, sendo avaliadas 10 amostras de cães não infectados (CNC) e 10 amostras de cães com LVCLVC. Para a sensibilização das placas, o peptídeo foi empregado na concentração de 0,25 µg por 100 µL/poço. As amostras de soro foram testadas nas diluições de 1:200, 1:400 e 1:600, enquanto o conjugado foi avaliado nas diluições de 1:12.000, 1:16.000 e 1:20.000 (Figura 5).

O melhor desempenho foi observado na diluição de soro 1:400 associada à diluição de conjugado 1:20.000, condição na qual 90% das amostras positivas foram corretamente identificadas, com taxa de positividade de 10% entre as amostras negativas. O valor de cut-off foi determinado a partir da média das densidades ópticas das amostras negativas acrescida de dois desvios padrão (média + 2DP), estratégia amplamente empregada para maximizar a especificidade do ensaio. Embora outras combinações tenham apresentado resultados semelhantes, como a diluição de soro 1:600 associada ao conjugado 1:16.000, optou-se pela condição 1:400/1:20.000 por apresentar melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, além de maior robustez analítica. Observou-se ainda que, na diluição 1:200 do soro, independentemente da diluição do conjugado, os valores de cut-off foram aparentemente superiores em relação às demais condições, possivelmente devido ao aumento da reatividade inespecífica, o que eleva as densidades ópticas das amostras negativas e, conseqüentemente, a média e o desvio padrão utilizados no cálculo. Por outro lado, embora diluições mais elevadas do soro possam reduzir essa reatividade inespecífica, elas também podem diminuir a intensidade do sinal das amostras positivas, aumentando o risco de resultados falso-negativos, especialmente em amostras com baixos títulos de anticorpos. Dessa forma, a condição 1:400 foi considerada mais adequada por proporcionar melhor discriminação entre os grupos controle negativo canino (CNC) e leishmaniose visceral canina (LVC), aliando desempenho diagnóstico satisfatório à otimização do consumo de reagentes. (Figura 5).



Fonte: Elaboração própria, 2024.

**Figura 5:** Padronização das melhores condições reacionárias do ensaio imunoenzimático (ELISA) para o peptídeo 47. No eixo x temos as diferentes diluições de soro (A: 1:200, B: 1:400, C: 1:600), e no eixo y temos a Densidade Óptica (DO), sendo que em cada fileira horizontal de resultados estão demonstrados os resultados nas diferentes diluições da concentração do conjugado (1:12.000, 1:16.000, 1:20.000). Os gráficos da fileira vertical à esquerda representam as curvas de titulação do soro para cada conjugado. O círculo claro representa as amostras de soro de cães Controle Negativo de Canil (CNC) e o círculo escuro representa as amostras de soro de cães naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral Canina (LVC). As linhas pontilhadas nos gráficos indicam os *cut-offs*.

Após a definição das condições ideais de padronização, o Pep 47 foi aplicado à soroteca do estudo, composta por 160 amostras de soro, para avaliação de seu desempenho diagnóstico, conforme apresentado na Figura 6.

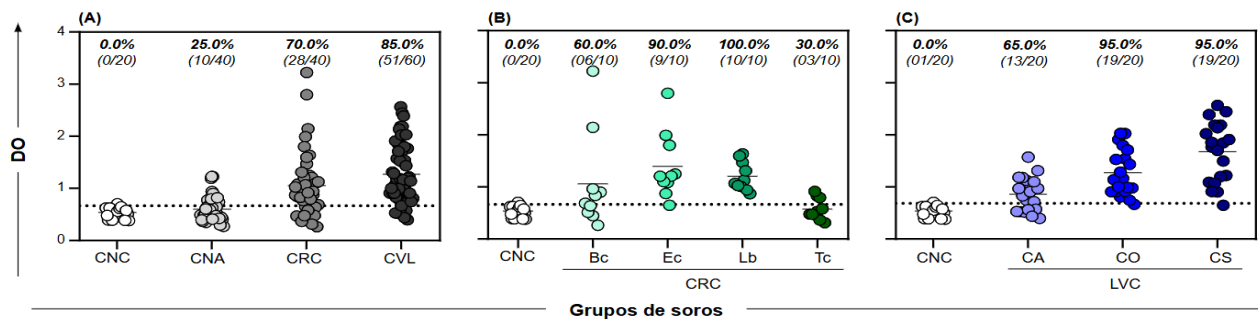
#### 4.2 Detecção de cães infectados por *L. infantum* em amostras de soro empregando o peptídeo 47 pelo ensaio imunoenzimático

O peptídeo selecionado por meio da bioinformática, denominado Pep 47, foi empregado no presente estudo e demonstrou capacidade de discriminar a maioria dos cães não infectados daqueles naturalmente infectados por *L. infantum*, independentemente da forma clínica da doença.

A análise dos resultados obtidos com o Pep 47 (Figura 6) evidenciou adequada distinção entre animais saudáveis e infectados, permitindo a avaliação de seu desempenho diagnóstico

Peptideo 47						
Teste	Positivo	Negativo	Total	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
Positivo	51	0	51	85.0% (73.9–91.9)	100.0% (83.9–100)	88.7% (79.9–93.9)
Negativo	9	20	29			
Total	60	20	80			

por meio dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia.



Fonte: Elaboração própria, 2024.

**Figura 6:** Performance do peptídeo 47 na detecção de cães não infectados e infectados por *L. infantum*. Nos três gráficos superiores temos no eixo x os grupos de soros experimentais e no eixo y a densidade óptica (A) Distribuição dos resultados de densidade óptica individuais dos Cães Negativo de Canil (CNC), Cães Negativos de Área Endêmica (CNA), Cães com Reatividade Cruzada (CRC) e Cães com Leishmaniose Visceral (LVC). (B) Distribuição dos resultados de densidade óptica individuais dos CNC e CRC, sendo *Babesia canis* (Bc), *Ehrlichia canis* (Ec), *Leishmania braziliensis* (Lb) e *Trypanosoma cruzi* (Tc). (C) Distribuição dos resultados de densidade óptica individuais dos CNC e cães infectados com *L. infantum* (LVC) segregados de acordo com sua apresentação clínica, Cães Assintomáticos (CA), Cães Oligossintomáticos (CO) e Cães Sintomáticos (CS). As linhas pontilhadas nos gráficos representam os *cut-offs*. Na tabela inferior temos apresentados os resultados de como o peptídeo 47 performou em termos de sensibilidade, especificidade e acurácia em CNC e cães infectados por *L. infantum*.

Em relação à reatividade sérica canina, considerando a análise global da soroteca sem estratificação dos grupos, o Pep 47 detectou 0/20 (0%) dos cães negativos de canil (CNC), 10/40 (25%) dos cães negativos provenientes de área endêmica, 28/40 (70%) dos cães com reações cruzadas (CRC) e 51/60 (85%) dos cães com LVC (Figura 6, coluna A).

Na Figura 6 (coluna B), referente à estratificação do grupo CRC, observou-se positividade em 6/10 (60%) cães infectados por *B. canis*, 9/10 (90%) por *E. canis*, 10/10 (100%) por *L. braziliensis* e 3/10 (30%) por *T. cruzi*. Esses achados evidenciam elevada ocorrência de reatividade cruzada, indicando potencial geração de resultados falso-positivos em cães não infectados por *L. infantum*, mas soropositivos para outros agentes infecciosos avaliados (Figura 6, coluna B).

O peptídeo avaliado no estudo mostrou baixa especificidade quando avaliado em amostras de animais com possíveis reações cruzadas como *B. canis*, *E. canis*, *L. braziliensis*. Mas, o peptídeo 47 apresentou baixa reatividade nas amostras de animais infectados por *T. cruzi*, em que positivou três animais e discriminou sete animais com Doença de Chagas. Assim, podemos dizer que o Pep47 apresentou homologia baixa entre os *Kinetoplastida*, apesar de muitos estudos indicarem reatividade cruzada com animais infectados pelo *T. cruzi*, devido ao compartilhamento de antígenos associados pela proximidade filogenética (CARVALHO *et al.*, 2018).

Não há dados consolidados sobre a prevalência da leishmaniose tegumentar americana em cães, contudo, é conhecido que os cães infectados por *L. braziliensis* apresentaram baixos níveis de anticorpos, o que torna controversa a relevância dessa reação cruzada no diagnóstico

da LVC. Entretanto, acreditamos que um teste sorológico ideal deva diferenciar as infecções caninas para as leishmanioses, mas, infelizmente, o peptídeo testado não foi capaz de promover diferenciação entre a LVC e a leishmaniose tegumentar canina. A reação cruzada com *B. canis* e *E. canis* revelou-se particularmente relevante, pois foi observado alta positividade cruzada. Um estudo realizado por (MOREIRA; MAIA, 2024) validando peptídeos sintéticos de células B, mostra que as reações cruzadas com *E. canis* apresentaram maior incidência de reatividade em todos os 10 peptídeos testados, os quais são derivados de proteínas de *Leishmania infantum*, mas testamos experimentalmente o peptídeo 47. A sequência e a proteína não podem ser divulgadas por patente. Fizemos análise de similaridade por BLASTp, priorizando conservação dentro de *Leishmania* e baixa similaridade com outros patógenos, para reduzir reação cruzada.” Atualmente, não há dados gerais sobre a prevalência da Ehrlichiose canina no Brasil, apenas prevalências específicas de estudos realizados com amostras pequenas em determinadas regiões. No entanto, Souza e colaboradores (2010) mencionam uma prevalência de 35,6% em um estudo conduzido em Salvador. Já SOARES indicam uma prevalência de 2% em um estudo realizado em Juiz de Fora (SOARES *et al.*, 2006). As reações cruzadas com *Ehrlichia canis* não representam uma preocupação relevante, considerando os baixos títulos de IgG anti-*E. canis* observados e encontrados em cães infectados (HOMER *et al.*, 2000).

Na análise estratificada das diferentes formas clínicas de LVC (Figura 6, coluna C), foi observada positividade em 13/20 (65%) dos cães assintomáticos (CA), 19/20 (95%) dos oligossintomáticos (CO) e 19/20 (95%) dos sintomáticos. Esses resultados demonstram que o Pep 47 foi capaz de detectar a maioria dos animais infectados, independentemente da forma clínica apresentada incluindo as amostras de cães assintomáticos. Sendo esse resultado favorável ao uso do peptídeo para reduzir resultados falso-negativos, que é um problema frequentemente observado nos testes preconizados pelo MS, possibilitando aumentar a eficácia na retirada de reservatórios da infecção nas áreas endêmicas (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2014; ZUBEN; DONALÍSIO, 2016). Por outro lado, o peptídeo 47 apresentou excelente desempenho em reconhecer os soros de animais verdadeiramente negativos, não apresentando nenhum resultado falso positivo em amostras negativas.

Quando considerados apenas os grupos verdadeiramente negativos (CNC) e verdadeiramente positivos (LVC), o Pep 47 apresentou sensibilidade de 85% e especificidade de 100%, com acurácia global de 88,7% (Figura 6).

O teste confirmatório ELISA-BioManguinhos (EIE) que emprega antígenos totais de *L. major*, apresenta 79% (70 – 86%) de sensibilidade e 84% (81 – 87%) de especificidade (GRIMALDI *et al.*, 2012; COURA-VITAL *et al.*, 2014; FRAGA *et al.*, 2016). Nesse contexto, é crucial encontrar antígenos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da doença. Isso ajudaria tanto no tratamento mais eficaz dos cães diagnosticados quanto na redução do número de novos casos da enfermidade (DIAS *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de testes de diagnóstico que utilizam peptídeos pode satisfazer essa necessidade de melhorarmos a acurácia diagnóstica no diagnóstico da LVC. Além disso, os peptídeos sintéticos oferecem várias vantagens, como baixo custo, produção química simples, alta reprodutibilidade, facilidade de armazenamento, estabilidade e segurança (CHAVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2013; MUCCI *et al.*, 2017; PANDEY; MALVIYA; DVORAKOVA,

2021). O uso de ferramentas de bioinformática facilita a previsão de epítomos imunodominantes a partir de sequências proteicas, reduzindo o trabalho de laboratório que pode ser caro e demorado. Além disso, os peptídeos podem ser identificados a partir de um ou mais antígenos e combinados para ampliar o número de epítomos reativos e melhorar a eficácia do diagnóstico (MUCCI *et al.*, 2017; PATTABHI *et al.*, 2010; ELISEI *et al.*, 2018).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a bioinformática utilizada na seleção de epítomos de células B demonstra um desempenho significativo na identificação de potenciais antígenos para o diagnóstico sorológico da LVC. Além disso, o peptídeo avaliado para o diagnóstico da LVC por meio do teste ELISA apresentou resultados satisfatórios na detecção de cães naturalmente infectados pelo parasito *L. infantum*. O peptídeo não demonstrou eficácia na redução de reações cruzadas contra outras doenças que são frequentemente observadas em testes sorológicos para LVC, ressaltando apenas uma boa discriminação em cães infectados pelo parasito de *T. cruzi*. Destacamos a eficácia deste peptídeo na identificação de animais assintomáticos, que continuam sendo um dos principais desafios dos métodos diagnósticos atuais, e representam a maioria dos soropositivos em regiões endêmicas. Os resultados obtidos indicam que o peptídeo avaliado apresenta potencial para aplicação como antígeno alternativo no diagnóstico da LVC por outros testes sorológicos, além disso, destacamos a relevância da imunoinformática na escolha racional de novos alvos antigênicos.

## 6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. A. et al. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 79–86, 2009.
- BELO, V. S. et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 195, n. 1-2, p. 1–13, 2013.
- 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. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- 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, 2020.
- 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.
- CARVALHO NETA, A. V. et al. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 480–488, 2006.
- COURA-VITAL, W. et al. Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 197, p. 411–417, 2013.
- COURA-VITAL, W. et al. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: a large-scale intervention study in an endemic area in Brazil. *PLoS ONE*, v. 13, n. 12, 2018.
- DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in the Americas: etiology, distribution, and clinical and zoonotic importance. *Parasites & Vectors*, v. 17, n. 1, p. 198, 30 abr. 2024.
- DIAS, D. S. et al. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitol. Int.*, v. 67, p. 344-350, 2018.

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.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 3, n. 2, p. 47–57, 2012.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED). Diretrizes normatizadas pelo Serviço de Doenças Parasitárias (SPD) da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças (DECD) do Instituto Octávio Magalhães (IOM), Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN/MG), Laboratório de Referência Nacional para Diagnóstico da Leishmaniose. Belo Horizonte: FUNED, 2021. (Portaria FUNED nº 92, de 24 de agosto de 2021).

GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J.*, v. 175, n. 1, p. 45-52, jan. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019>.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, p. 54–59, 2012.

LEISHVET. Canine and feline leishmaniosis: practical management of canine and feline leishmaniosis. 4. ed. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2018, p. 27. Disponível em: <http://www.leishvet.org/wpcontent/uploads/2018/04/LeishVet-Guidelines-4Ed.pdf>.

HOMER, M. J. et al. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*, v. 13, n. 3, p. 451–469, 2000.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clínica Veterinária*, v. 12, n. 71, p. 34-42, 2007.

LLANO, E. G. et al. Allopurinol y domperidona en el tratamiento de leishmaniosis visceral canina. *Revista de Veterinaria*, v. 31, n. 1, p. 20–27, 2020. DOI: 10.30972/vet.3114539.

MAIA, R. C. Seleção de potenciais peptídeos para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina por imunoinformática. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.

MAIA, Rodrigo da Costa. Seleção de potenciais peptídeos para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina por imunoinformática. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2023.

MOHAPATRA, T. M.; SINGH, D. P.; SEN, M. R.; BHARTI, K.; SUNDAR, S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries*, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 114–117, 8 mar. 2010. DOI: 10.3855/jidc.544. PMID: 20212344.

MOREIRA, G. J. L. Avaliação do potencial de peptídeos sintéticos de *Leishmania infantum* para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.

MOREIRA, G.; MAIA, R.; SOARES, N.; OSTOLIN, T.; COURA-VITAL, W.; AGUIAR SOARES, R.; RUIZ, J.; RESENDE, D.; BRITO, R.; REIS, A.; ROATT, B. Synthetic peptides selected by immunoinformatics as potential tools for the specific diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Microorganisms*, [S. l.], v. 12, n.906, p. 1-15, 2024.

MUCCI, J. et al. Nextgeneration ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 10, p. 005-972, 2017.

NOLI, C.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. An update on the treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary Journal*, v. 202, p. 425–435, 2014.

SABATÉ, D. et al. A randomized, blinded, controlled clinical trial to assess the efficacy of domperidone in the treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 206, p. 154–162, 2014.

NOYA, O. et al. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Current Protein & Peptide Science*, v. 4, n. 4, p. 299–308, 2003.

NUNES, C. M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, v. 170, p. 131–133, 2010.

RIBEIRO, C. R.; GONÇALVES, C. A.; CRUZ, L. M. et al. Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal –Brasil. *Ciência 47 Animal Brasileira*, [S. l.], v. 20, n. X, p. 1-8, 2019.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 165, p. 1–18, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors*, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. Leishvet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, [S. l.], v. 4, n. 86, p. 1 16, 2011.

VON ZUBEN, A. P. B.; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. *Cadernos de Saúde Pública*, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 1-11, 2016.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saúde Pública*, v. 48, n. 5, p. 851–855, 2014. WERNECK, Guilherme Loureiro; FIGUEIREDO, Fabiano Borges; CRUZ, Maria do Socorro Pires e. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of human visceral leishmaniasis: a community intervention trial in Brazil. *Pathogens*, Basel, v. 13, n. 2, p. 135, 2024.