



UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

MARIA EDUARDA GUEDES ONOFRE

**EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO CONTRA A
ENZIMA TRIPANOTONA REDUTASE DE *Leishmania braziliensis***

FORTALEZA

2025

MARIA EDUARDA GUEDES ONOFRE

EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO CONTRA A
ENZIMA TRIPANOTIONA REDUTASE DE *Leishmania braziliensis*

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

Orientadora Técnico-científica: Prof^a. Dr^a. Carla Freire Celedonio Fernandes.

FORTALEZA

2025

MARIA EDUARDA GUEDES ONOFRE

EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO CONTRA A
ENZIMA TRIPANOTONA REDUTASE DE *Leishmania braziliensis*

Monografia apresentada ao Curso de
Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia

Aprovada em: 21/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Drª. Carla Freire Celedonio Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz Ceará (Fiocruz Ceará)

Me. Anna Carolina Machado Marinho
Fundação Oswaldo Cruz Ceará (Fiocruz Ceará)

Aos sonhadores.

Aos meus pais, Eduardo e Edilene.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eduardo e Edilene, pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem e por serem meu porto seguro.

Ao meu namorado e melhor amigo, Pedro Lucas, por me escutar e me acalmar nos momentos ruins, me ajudar, por torcer por mim, por ser sempre fazer de tudo para me deixar feliz e por ser a minha paz em momentos de caos.

A minha família, por serem minha fortaleza.

A minha irmã Lívia, por ter aberto um caminho maravilhoso, me ensinar tudo o que sei sobre ciência e por sempre torcer por mim.

Aos meus irmãos, Lícia e Lucas, pelo incentivo e apoio.

Aos meus sobrinhos e primos, Miguel, Louise, Kalel, Bruno Filho e João Pedro por me trazerem paz e alegria.

A minha prima, Raissa, por sempre ser um ombro amigo.

A Prof^a. Dr^a. Carla Celedonio, pelo acolhimento, conversas e orientação.

Ao Prof. Dr. André Coelho e aos professores do curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará pela minha formação acadêmica.

Aos meus colegas da Fiocruz Ceará, Ângela Malaquias, Anna Carolina, Helen Costa, Maurício Fraga e Vânia Sousa pelo acolhimento e ensinamento. Em especial, aos meus amigos, Brunhild Maia, Larissa Queiroz, Marcus Rafael e Vivian Brandão, pelos cafés entre os experimentos, pelos ensinamentos e principalmente por me incluírem na vida de vocês.

Aos meus amigos de colégio, Pâmela, Pedro e Rafaela, por continuarem ao meu lado.

A Beatriz por trazer alegria ao meu dia a dia na UFC, pela amizade que nasceu no decorrer do curso, por me apoiar de forma quase incondicional, por acreditar em mim quando eu nem mesmo acredito, por todas as chamadas de vídeo durante a faculdade e por todos os momentos que vivemos.

A Júlia por me aguentar quase 24 horas por dia, por sempre ver o lado bom das coisas, por toda a ajuda no laboratório, pelas conversas no sofá da Fiocruz e no meu carro, pelas horas intermináveis de estudo juntas e por ser exatamente do seu jeitinho.

Aos amigos que a Biotecnologia me deu, Alana, Ana Carolina, Arlene, Beatriz, Gabrielly Alice, Guilherme, Ianah, Júlia, Laryssa, Levi, Luan, Pedro Victor, Samuel, Thiago, Vitória e Yandra. Obrigada por todos os momentos vividos, desde as aulas, disciplinas, conversas na locus, festas e choros.

Às pessoas que conheci em outros estados durante a trajetória da minha graduação.

À Instituição CNPQ, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio, a Fiocruz Ceará, por disponibilizar infraestrutura para a realização do presente trabalho e a UFC, por oportunizar minha formação acadêmica.

“Quem governa os sonhos, aparentemente, não é a razão, e sim o desejo, não é a cabeça, e sim o coração.” (DOSTOIÉVSKI, 1877, p. 55).

RESUMO

A leishmaniose, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é endêmica em 90 países, afetando 12 milhões de pessoas, com até 2 milhões de novos casos anuais. O tratamento convencional apresenta toxicidade elevada e resistência parasitária crescente, além de dificuldades no acesso a medicamentos. Alvos moleculares, como a enzima tripanotiona redutase, têm potencial terapêutico, protegendo o parasita do estresse oxidativo. Anticorpos de domínio único surgem como alternativa promissora devido à sua baixa imunogenicidade e versatilidade, permitindo sua aplicação como *intrabodies* em alvos intracelulares. O presente estudo teve como objetivo expressar, purificar e caracterizar anticorpos de domínio único (VHHs), previamente selecionados contra a enzima recombinante tripanotiona redutase (rTRLb) de *Leishmania braziliensis*, com vistas a sua aplicação como ferramenta terapêutica. Para isso, a enzima rTRLb e quatro clones de VHH anti-TRLb foram expressos em sistema microbiano em meio *Terrific Broth* (TB), suplementado com 1% de glicose 100 µg/mL de carbenicilina e purificados por cromatografia de afinidade em resina de níquel. Os clones purificados foram submetidos a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE 12,5%, além da metodologia de *Dot blot* e do teste de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para verificação da capacidade de reconhecimento da enzima. Após verificação de reatividade no *Dot blot*, apenas 3RT02 seguiu para o ELISA. O ensaio imunoenzimático ELISA confirmou a capacidade de reconhecimento antigênico observado por *Dot blot* e o clone parece demonstrar reatividade dose-dependente com atividade detectada a partir de 15,62 ng. Os resultados indicam que os anticorpos de domínio único possuem potencial para atuar no diagnóstico da doença e, se confirmada a capacidade de inibição da tripanotiona redutase, poderão ser úteis como nova abordagem terapêutica. Contudo, enfatiza-se a necessidade de estudos futuros para avaliação funcional mais detalhada, incluindo sua capacidade inibitória (IC₅₀) e reatividade cruzada com outras enzimas, inclusive de outros tripanossomatídeos.

Palavras-chave: leishmaniose; tripanotiona redutase; anticorpos de domínio único.

ABSTRACT

Leishmaniasis, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, is endemic in 90 countries, affecting 12 million people, with up to 2 million new cases a year. Conventional treatment has high toxicity and growing parasite resistance, as well as difficulties in accessing drugs. Molecular targets, such as the trypanothione reductase enzyme, have therapeutic potential, protecting the parasite from oxidative stress. Single domain antibodies have emerged as a promising alternative due to their low immunogenicity and versatility, allowing them to be applied as intrabodies to intracellular targets. The present study aimed to express, purify, and characterize single-domain antibodies (VHHs), previously selected against the recombinant enzyme trypanothione reductase (rTRLb) from *Leishmania braziliensis*, with a view to their application as a therapeutic tool. For this purpose, the rTRLb enzyme and four anti-TRLb VHH clones were expressed in a microbial system in Terrific Broth (TB) medium, supplemented with 1% glucose and 100 µg/mL carbenicillin, and purified by affinity chromatography using a nickel resin. The purified clones were subjected to electrophoretic analysis on a 12.5% SDS-PAGE gel, as well as Dot blot methodology and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to verify their ability to recognize the enzyme. After verifying reactivity in the Dot blot, only 3RT02 proceeded to ELISA. ELISA confirmed the antigen recognition capacity observed in the Dot blot, and the clone appeared to demonstrate dose-dependent reactivity, with activity detected from 15.62 ng. The results indicate that single-domain antibodies have the potential to be used in disease diagnosis and, if their ability to inhibit trypanothione reductase is confirmed, they could be useful as a novel therapeutic approach. However, further studies are needed for a more detailed functional evaluation, including their inhibitory capacity (IC₅₀) and cross-reactivity with other enzymes, including those from other trypanosomatids.

Keywords: leishmaniasis; trypanothione reductase; single-domain antibodies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Incidência de leishmaniose cutânea por 100000 habitantes na Região das Américas.	15
Figura 2 - Manifestações clínicas da LC.	16
Figura 3 – Manifestações clínicas da LM.....	17
Figura 4 - Sinais e sintomas da LV.....	18
Figura 5 – Ciclo biológico da <i>Leishmania spp.</i>	19
Figura 6 - Interação entre parasitas do gênero <i>Leishmania</i> e células do sistema imune	21
Figura 7 - O sistema dissulfeto de tripanotona.....	23
Figura 8 - Diagramas representativos de um anticorpo convencional, um HCAb e um VHH.25	
Figura 9 -- Esquema do vetor fagomídeo pHEN.....	31
Figura 10 - Representação esquemática da diluição do clone 3RT02.....	34
Figura 11 - Perfil eletroforético da enzima rTRLb purificada.....	35
Figura 12 - Perfil eletroforético da enzima rTRLb após diafiltração.....	37
Figura 13 - Perfil eletroforético dos clones de VHH anti-rTRLb.....	37
Figura 14 - Imunorreatividade do clones de VHH anti-rTRLb por <i>Dot blot</i>	38
Figura 15 - Detecção dos clones de VHH anti-rTRLb por <i>Dot blot</i>	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Imunorreatividade do clone de VHH anti-rTRLb (3RT02) por ELISA.....	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAR-T	Chimeric antigen receptor
CDR	Região determinante de complementaridade
CH	Região constante da cadeia pesada
CL	Região constante da cadeia leve
COVID	Corona Vírus Disease
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2</i>
FR	<i>Framework</i>
HCAb	<i>Heavy Chain-only Antibody</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC ₅₀	Concentração em que 50% da atividade de uma molécula está inibida
IL	Interleucina
IMAC	Cromatografia com metais imobilizados
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido
LB	Luria Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
mAb	Anticorpo monoclonal
MRI	Ressonância magnética
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio
Ni-NTA	Ácido nitrilotriacético de níquel
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

PD-1	<i>Programmed death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death 1 ligant</i>
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
pH	Potencial hidrogeniônico
Prx	2-Cys-peroxirredoxina
PYK	Piruvato quinase
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROOH	Hidroperóxidos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rTRLb	Tripanotiona redutase recombinante de <i>Leishmania braziliensis</i>
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T[S]2	Tripanotiona oxidada
T[SH]2	Tripanotiona reduzida
T0	Tempo antes da expressão
T4	Tempo após expressão
TB	<i>Terrific Broth</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TMB	3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Tripanotiona redutase
Tris	Tris hidroximetil aminometano
TXN	Triparedoxina
VH	<i>Variable heavy chain</i>
VHH	Variable-Heavy-Domain of Heavy-Chain
VL	<i>Variable light chain</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Da	Dalton
g	Gramma
°C	Graus Celsius
L	Litros
®	Marca Registrada
μ	Micro
k	Mil
m	Mili
M	Molar
n	Nano
nm	Nanômetros
%	Porcentagem
™	<i>Trade mark</i>
g	Vezeas a força gravitacional da Terra
V	Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Leishmaniose.....	14
1.2. Terapêutica da leishmaniose	19
1.3. Mecanismos de evasão do parasito	21
1.3.1. Tripanotiona redutase	22
1.1. Anticorpos de domínio único.....	24
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos gerais	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Expressão e purificação da tripanotiona redutase recombinante de <i>L. braziliensis</i> (rTRLb).....	30
3.2. Expressão e purificação de clone de VHH anti-rTRLb	31
3.3. SDS-PAGE	31
3.4. Dot blot	32
3.5. Imunorreatividade do clone por ELISA.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Expressão e purificação da enzima rTRLb.....	34
4.2. Expressão e purificação de VHHs anti-rTRLb.....	36
4.3. Reatividade dos VHH frente rTRLb	38
5. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

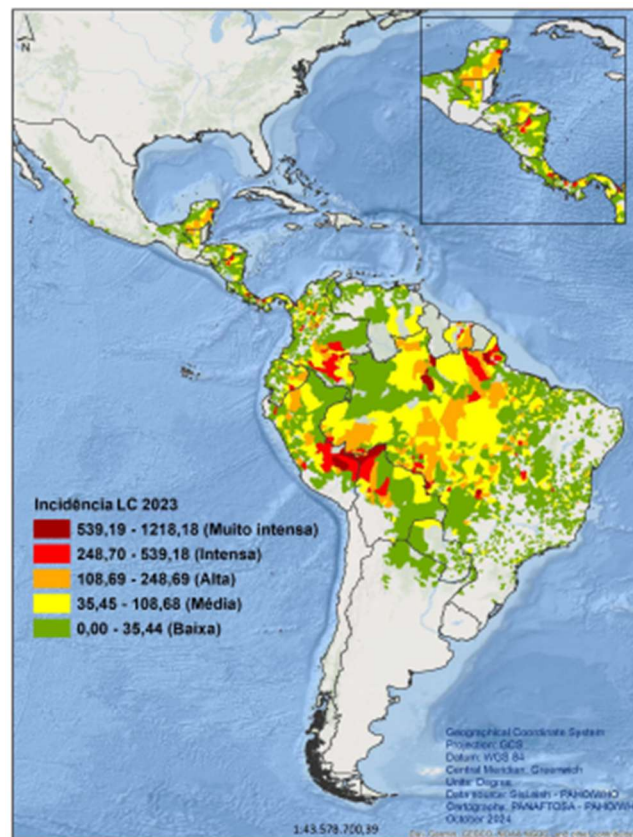
1.1. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada notificada e endêmica em mais de 90 países em todo o mundo. Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas estão em áreas com risco de infecção, com 12 milhões de casos prevalentes e incidência anual de 1,5 a 2 milhões de novos casos (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2022). Causada por protozoários do gênero *Leishmania*, a doença é transmitida pela picada de flebotomíneos infectados e pode manifestar-se em diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LM) e visceral (LV) (SERAFIM *et al.*, 2021).

A LC é a mais comum, com cerca de 700 mil a 1,2 milhão de novos casos registrados anualmente. Já a LV, que é mais grave, apresenta entre 50 mil e 90 mil novos casos por ano. As regiões mais afetadas incluem a Ásia, África, Oriente Médio e América Latina (ALATIF, 2021). A maior carga de LV concentra-se em países como Brasil, Índia, Sudão e Etiópia, que respondem por mais de 90% dos casos globais (OPAS, 2024). A distribuição da leishmaniose está intimamente ligada à presença de flebotomíneos, encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais. A transmissão ocorre predominantemente em ambientes rurais, mas a crescente urbanização da doença devido à migração e as mudanças climáticas têm ampliado a distribuição geográfica do vetor, aumentando o risco de surtos em áreas anteriormente não endêmicas (OPAS, 2024).

Além disso, altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente nas regiões em situação de vulnerabilidade socioeconômica, tornam a leishmaniose prioridade de saúde pública global. Fatores como pobreza, desnutrição, migrações populacionais e imunossupressão contribuem significativamente para a disseminação da doença (MANN *et al.*, 2021).

Figura 1- Incidência de leishmaniose cutânea por 100000 habitantes na Região das Américas.



Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de Informação Regional de Leishmanioses nas Américas (SisLeish). Washington, D.C.: OPAS; 2024.

1.1.1. Formas da doença e ciclo de vida

A LC caracteriza-se pelo aparecimento de pápulas no local da picada, que evoluem para úlceras em áreas expostas do corpo, como rosto e extremidades (Figura 2). As lesões podem ser únicas ou múltiplas e geralmente se resolvem espontaneamente, mas deixam cicatrizes permanentes (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021). Há diferenças marcantes entre as espécies do Velho Mundo (*Leishmania major*, *L. tropica*) e do Novo Mundo (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*), a segunda frequentemente resulta em lesões mais severas e disseminadas (DE VRIES; SCHALLIG, 2022; NUWANGI *et al.*, 2023). A Organização Mundial da Saúde estima uma incidência global de 700 mil a 1 milhão de casos de LC por ano, com 95% concentrados em países como Brasil, Colômbia e Peru. No Brasil, a LC é uma preocupação de saúde pública, com variações espaciais e temporais significativas ao longo das últimas décadas (REIS *et al.*, 2024).

Figura 2 - Manifestações clínicas da LC.



Fonte: ABADIÁS-GRANADO *et al.*, (2021). A---C, Presença de pápula ou nódulo eritematoso exibindo crescimento progressivo e tendência a ulcerar em áreas expostas, como face ou extremidades, é a apresentação mais característica da leishmaniose cutânea. D, alguns pacientes têm lesões múltiplas ou apresentações atípicas, como a lesão verrucosa neste paciente com leishmaniose cutânea do Novo Mundo. Imagem clínica (E) e dermatoscópica (F) de lesão de leishmaniose cutânea no antebraço mostrando ulceração central circundada por uma área eritematosa com vasos periféricos polimorfos e em gancho (asteriscos) e estruturas branco-amareladas em forma de lágrima (setas).

A leishmaniose mucocutânea é uma forma crônica e desfigurante da leishmaniose, que frequentemente se desenvolve como uma complicação tardia da LC, caracterizada pelo comprometimento das mucosas do trato respiratório superior. Geralmente, é causada por espécies do complexo *Leishmania braziliensis*, predominando em regiões endêmicas da América Latina, como Brasil, Bolívia e Peru (DE VRIES; SCHALLIG, 2022).

Figura 3 – Manifestações clínicas da LM.



Fonte: ABADÍAS-GRANADO *et al.*, (2021). A, A leishmaniose mucocutânea se manifesta como uma úlcera crônica que afeta frequentemente a mucosa nasal. B, Pápulas firmes de leishmaniose cutânea na palma da mão de um paciente coinfectado com leishmaniose visceral e vírus da imunodeficiência humana. C, Máculas hiperpigmentadas na região do pescoço. D, Máculas hipopigmentadas como manifestação de leishmaniose dérmica pós-calazar em menino de 7 anos.

A LV, também conhecida como calazar, é a forma mais grave da leishmaniose, que sem um tratamento adequado pode ser fatal. A doença é causada pelos protozoários *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*. Os sintomas mais comuns incluem febre irregular, perda de peso, fraqueza, palidez, hepatomegalia e esplenomegalia (Figura 4). Esses sinais são causados pela disseminação do parasita no sistema reticuloendotelial, atingindo fígado, baço e medula óssea (COSTA *et al.*, 2023; SAMANT *et al.*, 2021). A LV é endêmica em mais de 70 países e afeta principalmente áreas tropicais e subtropicais. Indivíduos imunocomprometidos, como aqueles coinfectados com HIV, estão em maior risco de desenvolver a forma sintomática da doença. Outros fatores incluem desnutrição e condições de pobreza, que limitam o acesso ao diagnóstico e tratamento (SCARPINI *et al.*, 2022).

Figura 4 – Sinais e sintomas da LV.



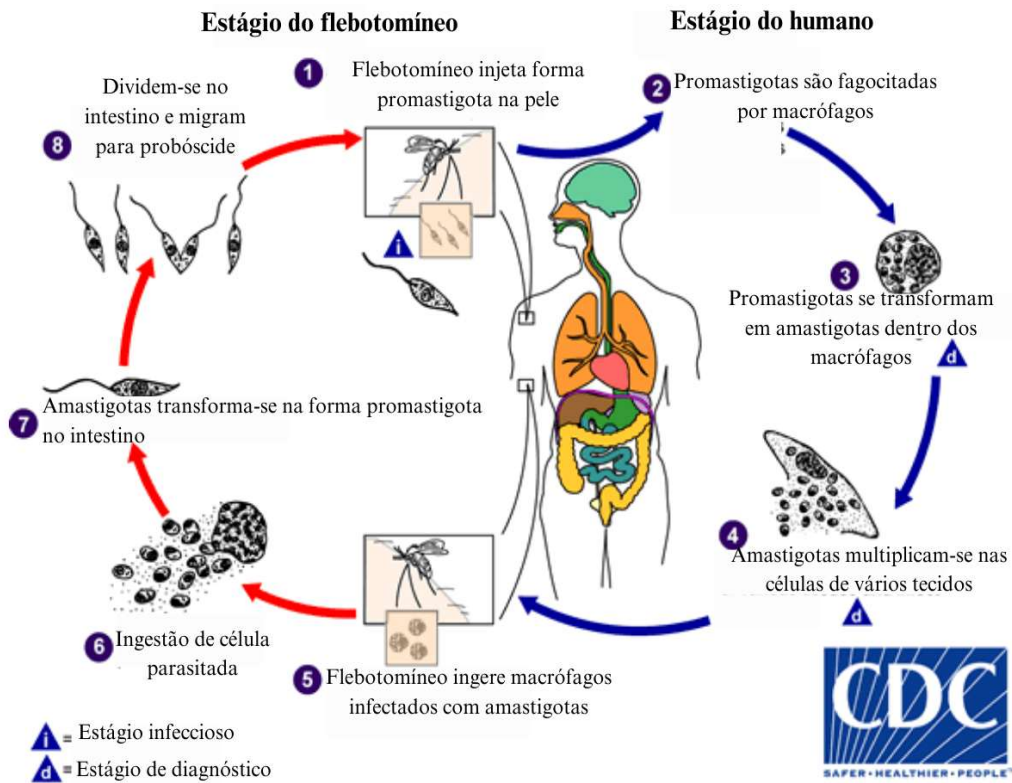
Fonte: Adaptado de COSTA *et al.*, (2023). A, uma doença não complicada com hepatoesplenomegalia e palidez. B, hematomas extensos. C, grande hepatoesplenomegalia, com ascite e edema do escroto.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma importante doença parasitária endêmica em várias regiões do Brasil. É causada por protozoários do gênero *Leishmania*, principalmente as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, que são transmitidas por insetos flebotômíneos. A LTA pode se manifestar de forma cutânea, mucosa ou mucocutânea, dependendo do patógeno envolvido e da resposta imune do hospedeiro (BELO *et al.*, 2023; MARINHO-JÚNIOR *et al.*, 2023). A forma cutânea da LTA é a mais comum e se caracteriza por lesões ulceradas em áreas expostas, que podem ser únicas ou múltiplas. Já a forma mucosa ocorre devido à disseminação do parasita para as mucosas do trato respiratório superior, resultando em ulcerações que afetam nariz, boca e garganta. Essa forma pode levar a deformidades severas se não tratada (BELO *et al.*, 2023).

O ciclo de vida do parasita *Leishmania* envolve dois hospedeiros: o vetor flebotômíneo e um hospedeiro vertebrado (Figura 5). A transmissão ocorre quando um flebotômíneo infectado pica um vertebrado e libera promastigotas metacíclicos, a forma infecciosa do parasita, na pele do hospedeiro. No organismo vertebrado, os promastigotas são fagocitados por macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas, a forma intracelular replicativa. Os amastigotas multiplicam-se dentro do fagolisossomo, levando à lise da célula hospedeira e à disseminação do parasita para novas células. Quando um flebotômíneo não infectado se alimenta do sangue de um hospedeiro contaminado, ele ingere amastigotas, que, em seu intestino, diferenciam-se primeiro em promastigotas pró-cíclicos e depois em promastigotas metacíclicos. Esses últimos migram para a faringe do inseto, completando o ciclo. A eficiência da infecção depende de interações complexas entre o parasita e o hospedeiro, incluindo modulação do sistema imunológico para evitar sua eliminação e adaptação ao

ambiente intestinal do flebotomíneo, garantindo sua sobrevivência e transmissão (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022).

Figura 5 – Ciclo biológico da *Leishmania spp.*



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2024). Representação esquemática do ciclo de vida do parasita *Leishmania* envolvendo dois hospedeiros: o flebotomíneo (vetor) e o hospedeiro humano. No estágio do flebotomíneo, amastigotas ingeridas durante a alimentação no hospedeiro humano transformam-se em promastigotas no intestino do vetor, migram para a probóscide e tornam-se infectantes. No estágio do hospedeiro humano, os promastigotas são fagocitados por macrófagos, diferenciam-se em amastigotas, multiplicam-se dentro das células hospedeiras e disseminam-se para infectar novos tecidos.

1.2. Terapêutica da leishmaniose

A terapia da leishmaniose é complexa e depende do tipo clínico da espécie de *Leishmania*, e do contexto epidemiológico. Apesar dos avanços na pesquisa, os tratamentos atuais enfrentam desafios como toxicidade, resistência a medicamentos e acessibilidade limitada em regiões endêmicas.

Os tratamentos convencionais incluem os antimoniais pentavalentes, como o meglumina antimoniato e o estibogluconato de sódio, que foram a primeira linha de tratamento por décadas. O mecanismo de ação dessa classe ainda não é completamente compreendido, porém, evidências sugerem que esses compostos atuam como pró-fármacos, sendo reduzidos

da forma pentavalente (Sb^{5+}) para a forma trivalente (Sb^{3+}), que é considerada a forma ativa e tóxica para os parasitas. Essa conversão ocorre tanto nos macrófagos hospedeiros quanto nos próprios parasitas, dependendo dos sistemas enzimáticos presentes. A forma trivalente interfere em processos metabólicos essenciais para a sobrevivência do parasita, como a inibição de topoisomerases, além de causar disfunção mitocondrial, e indução de estresse oxidativo (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021; KUMARI *et al.*, 2021). No entanto, sua administração intravenosa ou intramuscular prolongada, toxicidade elevada e crescente resistência reduziram sua eficácia em várias regiões, especialmente no subcontinente indiano (SUNDAR *et al.*, 2024).

Entre as opções terapêuticas atuais, destaca-se a anfotericina B, que substituiu os antimoniais em várias regiões endêmicas, especialmente para a leishmaniose visceral. Embora sua eficácia seja alta, ela apresenta limitações significativas, como nefrotoxicidade e necessidade de administração intravenosa prolongada. Formulações lipossomais da anfotericina B, como o Ambisome®, têm sido usadas para minimizar esses efeitos colaterais, mas o alto custo e os requisitos de armazenamento refrigerado dificultam seu acesso em regiões menos favorecidas (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021; SUNDAR *et al.*, 2024). A miltefosina, primeiro medicamento oral desenvolvido para a leishmaniose, oferece uma alternativa promissora, especialmente para formas cutâneas e viscerais. No entanto, sua administração prolongada e seu potencial teratogênico limitam sua aplicabilidade em mulheres grávidas e em idade fértil. Além disso, casos de resistência ao miltefosina têm sido relatados em várias regiões, comprometendo sua eficácia a longo prazo (PRADHAN *et al.*, 2022).

Outra abordagem em destaque é a combinação de medicamentos, como anfotericina B lipossomal e paromomicina, para reduzir a duração do tratamento, aumentar a eficácia e prevenir o desenvolvimento de resistência. Terapias locais, incluindo crioterapia e termoterapia, têm sido exploradas para a leishmaniose cutânea em casos menos graves, reduzindo a necessidade de exposição sistêmica a medicamentos tóxicos. Recentemente, estratégias utilizando nanotecnologia, estão sendo investigadas para melhorar a entrega e a eficácia dos medicamentos. Essas abordagens incluem nanopartículas para direcionar medicamentos diretamente às células infectadas, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos. Além disso, terapias imunomoduladoras e vacinas em desenvolvimento oferecem esperança para a prevenção e o tratamento de formas resistentes da doença (BRINDHA; BALAMURALI; CHANDA, 2021; KUMARI *et al.*, 2021; PRADHAN *et al.*, 2022).

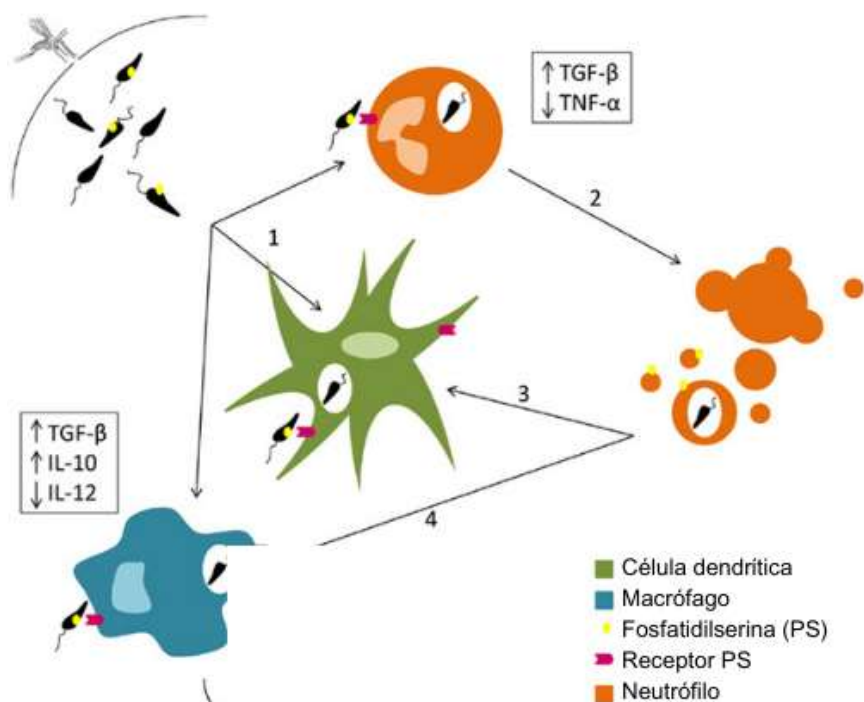
Embora avanços importantes tenham sido alcançados, os desafios permanecem na distribuição equitativa de medicamentos, especialmente em áreas de baixa renda. Assim, o

desenvolvimento de terapias acessíveis e eficazes continua sendo uma prioridade para combater essa doença negligenciada. Além disso, os efeitos colaterais devido ao uso prolongado da terapêutica atual e a incidência de resistência do parasito aos medicamentos, levaram a busca por novos alvos para o tratamento da leishmaniose.

1.3. Mecanismos de evasão do parasito

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam uma variedade de mecanismos para evadir a resposta imune do hospedeiro, garantindo sua sobrevivência e disseminação. Incluindo alterações em vias celulares, manipulação de respostas imunológicas inatas e adaptativas, e subversão de processos celulares críticos do hospedeiro. Após a transmissão, o parasita invade neutrófilos e macrófagos, células essenciais na resposta imune inicial (Figura 6). No entanto, *Leishmania* utiliza os neutrófilos como "cavalo de Troia", prolongando sua vida útil por meio de inibição da apoptose e secreção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β , que suprimem a ativação imune. Esses neutrófilos infectados atraem macrófagos, permitindo que os parasitas sejam fagocitados de forma "silenciosa", sem ativação imunológica efetiva (CECÍLIO *et al.*, 2014; GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013).

Figura 6 - Interação entre parasitas do gênero *Leishmania* e células do sistema imune.



Fonte: Adaptado de CECÍLIO *et al.*, (2014). Entrada silenciosa da *Leishmania* nas células do hospedeiro. Parasitas vivos e mortos são fagocitados por fagócitos. O

reconhecimento da fosfatidilserina externalizada presente na membrana celular dos parasitas mortos induz a secreção de TGF- β e a *downregulação* do TNF- α (1). A apoptose dos neutrófilos é retardada pela *Leishmania* (2). Tanto as células dendríticas (3) quanto os macrófagos (4) removem os corpos apoptóticos dos neutrófilos que carregam promastigotas de *Leishmania* e secretam TGF- β e IL-10. Os macrófagos (5) também podem fagocitar parasitas extraídos dentro de fragmentos de membrana de outros macrófagos, o que, por sua vez, promove a secreção de IL-10.

Dentro dos macrófagos, os parasitas inibem a explosão respiratória, um mecanismo essencial para a eliminação de patógenos, e alteram a maturação do fagolisossomo, criando um ambiente favorável para sua multiplicação. Além disso, o parasita manipula vias de sinalização intracelulares, como a ativação da ERK1/2 e a inibição da via apoptótica mitocondrial, promovendo a sobrevivência prolongada dos macrófagos infectados. Outro mecanismo crítico envolve a modulação de receptores do complemento, permitindo que o parasita entre nas células sem desencadear respostas inflamatórias significativas (DE CASTRO NETO; DA SILVEIRA; MORTARA, 2021; FIGUEIREDO; SOUZA-TESTASICCA; AFONSO, 2016).

A regulação negativa de citocinas inflamatórias, como TNF- α , e a indução de citocinas imunossupressoras, como IL-10, são fundamentais para o sucesso do parasita. Além disso, o sinal purinérgico desempenha um papel importante na imunomodulação, com a *Leishmania* promovendo o aumento de adenosina extracelular, que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e o *burst* oxidativo. Essas adaptações não apenas permitem a sobrevivência do parasita, mas também criam um ambiente que favorece sua replicação e a persistência da infecção (CECÍLIO *et al.*, 2014; FIGUEIREDO; SOUZA-TESTASICCA; AFONSO, 2016).

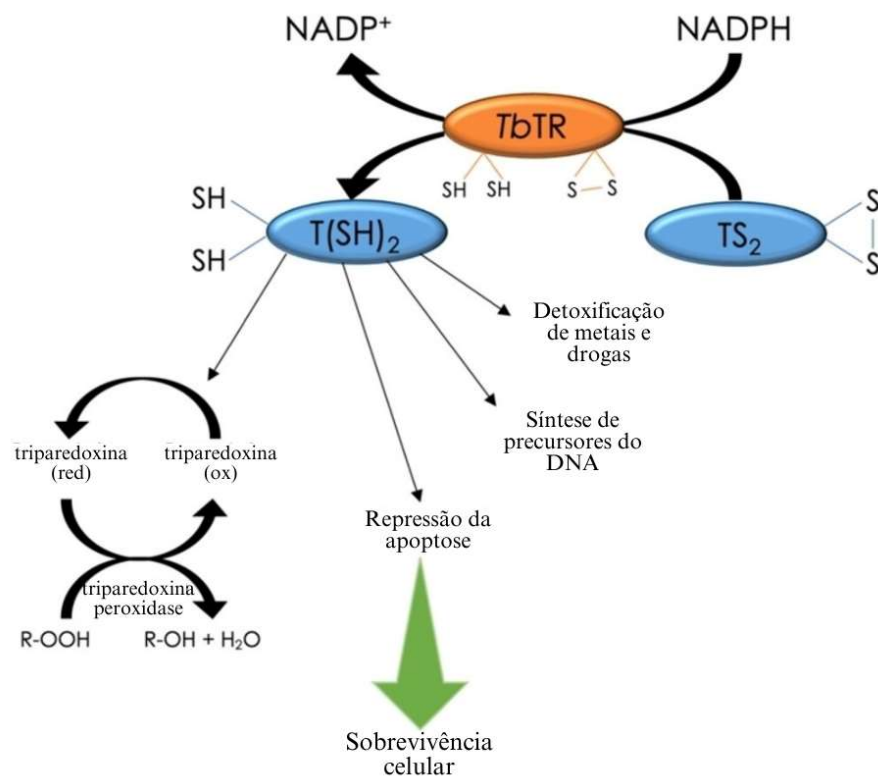
Esses mecanismos de evasão ilustram como a coevolução entre o parasita e o hospedeiro resultou em estratégias altamente sofisticadas, destacando a complexidade das interações parasita-hospedeiro e os desafios no desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes.

1.3.1. Tripanotiona redutase

A tripanotiona redutase é uma enzima essencial para a sobrevivência dos parasitas do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, pertencentes à família *Trypanosomatidae*. Este grupo de protozoários utiliza um mecanismo exclusivo de homeostase redox baseado na tripanotiona, que substitui o sistema de glutathione encontrado em organismos mamíferos. Essa enzima catalisa a redução da tripanotiona oxidada (T[S]2) em sua forma reduzida (T[SH]2), utilizando

NADPH como fonte de elétrons. Esse processo é essencial para regenerar moléculas antioxidantes e proteger o parasita contra danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). A tripanotiona reduzida age como um doador de elétrons para outras enzimas no sistema redox, como a triparedoxina, que é crucial para a detoxificação de peróxidos e a manutenção da integridade celular (Figura 7). Esse mecanismo é particularmente importante porque os parasitas vivem em ambientes ricos em oxidantes, como os macrófagos ativados do hospedeiro, onde enfrentam altas concentrações de ROS e óxido nítrico como parte da resposta imune inata (GONZÁLEZ-MONTERO *et al.*, 2024; SANTI; MURTA, 2022).

Figura 7 - O sistema dissulfeto de tripanotiona.



Fonte: Adaptado de STEFANO ZINEDDU *et al.* (2024). A tripanotiona é mantida diretamente no estado reduzido às custas do NADPH pela tripanotiona redutase. Por sua vez, a tripanotiona reduz vários substratos, incluindo a triparedoxina, e está, portanto, envolvida em vários processos fundamentais para a sobrevivência do parasita.

O ciclo catalítico da tripanotiona redutase começa com a ligação do NADPH ao sítio ativo da enzima, transferindo um par de elétrons para um grupo dissulfeto no centro ativo. Esse grupo dissulfeto é reduzido a um ditiol, que então transfere os elétrons para a tripanotiona oxidada, convertendo-a em sua forma reduzida. Durante esse processo, a enzima passa por

mudanças conformacionais que facilitam a interação com seus substratos e promovem a eficiência do ciclo redox. A capacidade da tripanotiona redutase de realizar múltiplos ciclos catalíticos sem degradação torna-a extremamente eficiente na manutenção do equilíbrio redox celular (GONZÁLEZ-MONTERO *et al.*, 2024; HORN, 2022). A inibição da tripanotiona redutase compromete a capacidade do parasita de neutralizar esses agentes oxidantes, resultando em danos às membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos, levando, em última instância, à morte celular (VÁZQUEZ *et al.*, 2017).

Além de sua função antioxidante, a tripanotiona redutase está envolvida em outros processos metabólicos críticos, como a biossíntese de precursores de DNA e a regulação do metabolismo energético do parasita. A enzima também contribui para a detoxificação de xenobióticos e metais pesados, protegendo o parasita de compostos tóxicos no ambiente do hospedeiro (Figura 7). Isso é particularmente relevante no contexto da resistência a medicamentos, pois a tripanotiona redutase pode ajudar os parasitas a neutralizarem agentes quimioterápicos que geram estresse oxidativo como mecanismo de ação (BATTISTA *et al.*, 2020).

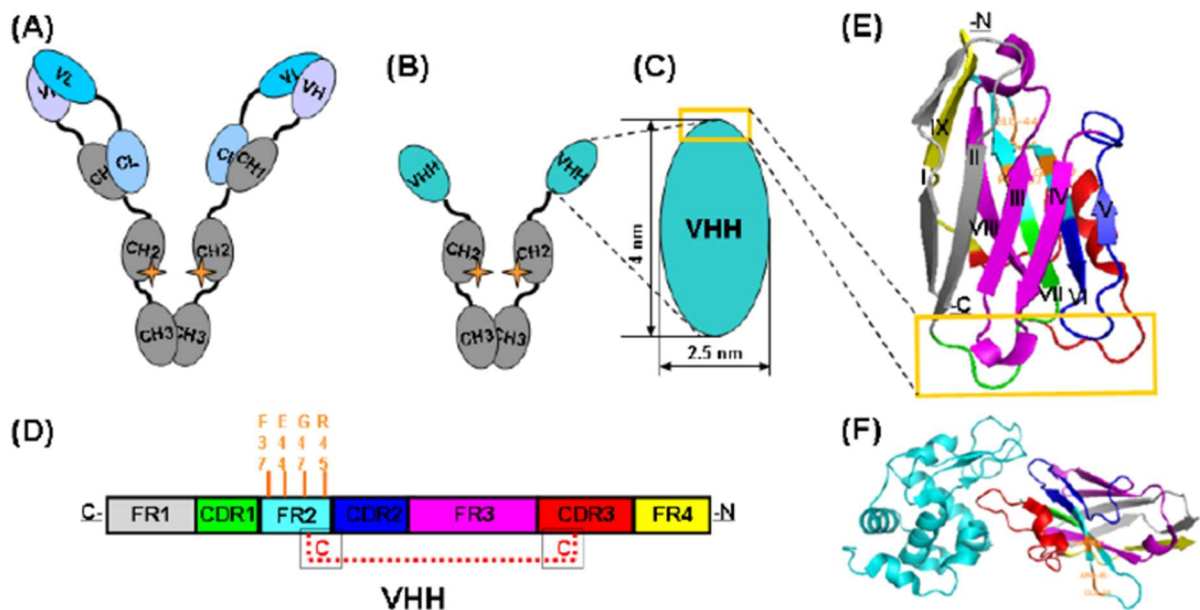
O potencial terapêutico da TR é devido à ausência desse sistema metabólico em células humanas, o que minimiza os riscos de efeitos colaterais nos hospedeiros. Estudos estruturais e bioquímicos detalhados identificaram sítios ativos na enzima que podem ser explorados para o design de inibidores seletivos (TIWARI; TANWAR; MUNDE, 2018). A resistência aos medicamentos atualmente utilizados para tratar a leishmaniose e outras doenças tropicais negligenciadas está cada vez mais associada à capacidade dos parasitas de adaptar seus mecanismos antioxidantes. Isso inclui a superexpressão da tripanotiona redutase ou mutações que aumentam sua afinidade pelo NADPH, permitindo uma resposta mais eficiente ao estresse oxidativo. Dessa forma, o desenvolvimento de inibidores que possam superar essas adaptações é um foco importante da pesquisa atual (GONZÁLEZ-MONTERO *et al.*, 2024; HORN, 2022; SANTI; MURTA, 2022).

1.1. Anticorpos de domínio único

Anticorpos de domínio único (VHH ou nanocorpos) são derivados das imunoglobulinas de cadeia pesada de camelídeos (HCAb), como camelos, lhamas e alpacas. Descobertos em 1993, HCAb são únicos na natureza por serem desprovidos das cadeias leves, diferentemente das imunoglobulinas G convencionais (HAMERS-CASTERMAN *et al.*, 1993). A estrutura reduzida dos VHHs, composta por apenas um domínio variável da cadeia pesada,

confere a eles propriedades notáveis, incluindo pequeno tamanho (~15 kDa), alta afinidade por antígenos e capacidade de penetração tecidual (Figura 8). Essa simplicidade estrutural os torna ferramentas valiosas para uma ampla gama de aplicações biotecnológicas (JIN *et al.*, 2023; TANG; GAO; HAN, 2023; YU *et al.*, 2024). Os VHHs apresentam algumas vantagens sobre os anticorpos monoclonais (mAbs), devido ao seu tamanho reduzido, exibem melhor penetração em tecidos densos, incluindo tumores sólidos, e podem atravessar barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica. Isso os torna altamente promissores para o tratamento de doenças neurológicas e no desenvolvimento de diagnósticos baseados em imagens moleculares. Além disso, os VHHs são produzidos de forma eficiente em sistemas bacterianos ou em leveduras, reduzindo significativamente os custos de produção em comparação com os mAbs, que geralmente requerem sistemas de expressão mais complexos, como células de mamíferos (KIM *et al.*, 2023; MUYLDERMANS, 2025; PILLAY; MUYLDERMANS, 2021).

Figura 8 - Diagramas representativos de um anticorpo convencional, um HCAb e um VHH.



Fonte: LOPEZ CARDOSO *et al.*, (2012). (A) Um anticorpo IgG convencional é uma molécula dimérica, e cada monômero é composto por uma cadeia pesada e uma cadeia leve. A cadeia pesada contém os domínios constantes (CH1, CH2 e CH3) e o domínio variável (VH). A cadeia leve possui apenas um domínio conservado (CL) e um domínio variável (VL). (B) O HCAb, que não possui a cadeia leve nem o CH1, contém o paratopo (caixa amarela) presente apenas no único domínio variável (VHH). (C) O VHH com aproximadamente 15 kDa. A caixa amarela destaca o local de ligação ao antígeno. (D) A sequência do VHH é composta por quatro Regiões Estruturais (FR1, cinza claro; FR2, ciano; FR3, magenta; e FR4, amarelo) e três Regiões Determinantes da Complementaridade (CDR1, verde; CDR2, azul; e CDR3, vermelho). Os resíduos F37, E44, G47 e R45 (laranja) estão localizados na FR2 e mascaram uma região hidrofóbica. C, terminal C; N, terminal N. A linha vermelha pontilhada representa uma ligação dissulfeto entre a FR2 e a CDR3, que estabiliza a molécula e está presente em dromedários. (E) Estrutura tridimensional de um VHH anti-lisozima, mostrando o dobramento do tipo Ig, com folhas β organizadas em cinco fitas na parte frontal (números romanos: I – V) e quatro na parte traseira (VI – IX). A caixa amarela ampliada mostra o local de ligação ao antígeno, formado pela justaposição das três CDRs. (F) O VHH mostrado em (E) é representado em complexo com a lisozima (azul claro). Um paratopo saliente, composto principalmente

pela CDR3 (vermelho), reconhece e se liga à fenda catalítica da lisozima, inibindo sua atividade.

Uma das principais características dos VHHs é a presença de três regiões determinantes de complementaridade (CDRs), responsáveis pela ligação ao antígeno. A CDR3, em particular, é mais longa e flexível em comparação com a dos anticorpos convencionais, permitindo que se liguem a epítomos inacessíveis a outros tipos de anticorpos. Essa capacidade é especialmente útil para atingir antígenos localizados em locais difíceis, como fendas enzimáticas ou interfaces proteicas, o que aumenta sua versatilidade terapêutica. Além disso, a presença de pontes dissulfeto adicionais, especialmente em regiões de ligação ao antígeno, contribui para a estabilidade estrutural e funcional dos VHHs (ARBABI-GHAHROUDI, 2022; KURODA; TSUMOTO, 2023).

As regiões de *framework* (FR) dos VHHs também apresentam adaptações importantes. Enquanto os anticorpos convencionais possuem interações hidrofóbicas significativas entre as cadeias leve e pesada, os VHHs substituem essas interações por resíduos hidrofílicos em posições críticas, como nos locais equivalentes a interface VH-VL. Essa adaptação aumenta a solubilidade e previne a formação de agregados. Além disso, a sua arquitetura compacta reduz a entropia associada ao dobramento, melhorando estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e presença de proteases (ESKIER *et al.*, 2023; KURODA; TSUMOTO, 2023). Outra característica importante é a capacidade dos anticorpos de domínio único de se ligarem com alta afinidade a seus alvos, mesmo na ausência de uma cadeia leve. Essa afinidade é reforçada pela otimização evolutiva de resíduos-chave nas regiões CDR e FR. A introdução de pontes salinas e a conservação de resíduos aromáticos e hidrofílicos em posições específicas contribuem para a formação de interfaces de ligação altamente específicas e robustas (ESKIER *et al.*, 2023).

Apesar de suas inúmeras vantagens, os VHHs enfrentam desafios relacionados à imunogenicidade e à curta meia-vida *in vivo*. Para mitigar esses problemas, estratégias como a humanização e o uso de peguilação (conjugação com polietilenoglicol) têm sido empregadas para reduzir a resposta imune adversa em pacientes e prolongar sua meia-vida. Além disso, o uso de plataformas de exibição em fagos ou leveduras tem acelerado o processo de seleção e desenvolvimento de VHHs direcionados a antígenos específicos (MUYLDERMANS, 2025; TANG; GAO; HAN, 2023).

1.1.1. Aplicação dos anticorpos de domínio único

No campo da terapia, os VHHs têm mostrado potencial significativo no tratamento de doenças como câncer, doenças autoimunes e infecções virais. Por exemplo, o Caplacizumab, o primeiro nanocorpo aprovado clinicamente, é utilizado para tratar púrpura trombocitopênica trombótica adquirida, uma doença autoimune rara. No campo da oncologia, eles foram projetados para se ligar a receptores específicos, como HER2 e EGFR, utilizados no tratamento direcionado de tumores sólidos. Além disso, sua capacidade de se ligar a múltiplos epítomos permite o desenvolvimento de moléculas multivalentes, que podem aumentar a eficácia terapêutica ao atingir diferentes alvos simultaneamente (ARBABI-GHAHROUDI, 2022; FRIDY; ROUT; KETAREN, 2024; MUYLDERMANS, 2025). Na imunoterapia, eles têm sido projetados para modular respostas imunes, como bloquear interações entre PD-1/PD-L1 e CTLA-4, que são importantes nos pontos de verificação imune. Eles também são utilizados em abordagens CAR-T (receptores de antígenos quiméricos) para reprogramar células T, ampliando sua capacidade de atacar células tumorais específicas. Em doenças infecciosas, como COVID-19, nanocorpos têm demonstrado eficácia em neutralizar o vírus SARS-CoV-2, ligando-se ao domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína *Spike*, inibindo a entrada viral (KIM *et al.*, 2023; PILLAY; MUYLDERMANS, 2021).

Os VHHs estão sendo desenvolvidos para tratar envenenamentos por mordidas de serpentes, como uma alternativa para a soroterapia. Oferecem vantagens significativas sobre antivenenos convencionais, como melhor penetração tecidual e capacidade de neutralizar toxinas locais e sistêmicas. Os VHHs podem ser produzidos de forma econômica e apresentam alta especificidade para toxinas, reduzindo os efeitos adversos e melhorando a eficácia do tratamento (FERNANDES *et al.*, 2021; MACHADO MARINHO *et al.*, 2024).

Os anticorpos de domínio único são amplamente utilizados em plataformas diagnósticas devido à sua estabilidade térmica, alta afinidade por antígenos e facilidade de produção. Podem ser funcionalizados com agentes fluorescentes, enzimáticos ou de contraste, permitindo sua aplicação em testes rápidos, biossensores e técnicas de imagem molecular. Por exemplo, VHHs conjugados com fluoróforos são usados para detectar biomarcadores de doenças infecciosas, como o SARS-CoV-2, em ensaios de fluxo lateral. Além disso, eles têm sido empregados em tomografia por emissão de pósitrons (PET) e ressonância magnética (MRI), onde sua capacidade de penetrar em tecido melhora a qualidade da imagem e a especificidade para alvos moleculares específicos (JIN *et al.*, 2023; PILLAY; MUYLDERMANS, 2021; TANG; GAO; HAN, 2023).

No âmbito de doenças parasitárias, está sendo explorado o uso de VHHs para inibir de forma alostérica a atividade da piruvato quinase (*PYK*), uma enzima essencial no

metabolismo energético de tripanossomatídeos, como *Trypanosoma brucei* e *Leishmania mexicana*. O VHH sdAb42 foi identificado como altamente eficaz ao se ligar seletivamente à *PYK*, estabilizando-a em seu estado inativo (estado T) e, assim, comprometendo a capacidade do parasita de sustentar seu metabolismo. Esse mecanismo de ação foi validado em modelos transgênicos de *T. brucei*, nos quais a expressão intracelular do sdAb42 resultou em redução significativa no crescimento dos parasitas. Sugerindo que o sdAb42 pode ser utilizado como uma ferramenta para desenvolver novas estratégias terapêuticas contra doenças causadas por tripanossomatídeos, como a tripanossomíase africana e a leishmaniose, explorando o metabolismo energético exclusivo desses parasitas (TORRES *et al.*, 2024).

Portanto, explorar as características específicas dos anticorpos de domínio única para o tratamento da leishmaniose seria interessante. Principalmente visando a possibilidade de eles atuarem como *intrabodies*, permitindo a entrada em membranas biológicas, que no caso da tripanotona redutase seria essencial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar a interação de anticorpos de domínio único (VHH) contra a enzima tripanotiona redutase recombinante de *Leishmania braziliensis* (rTRLb) com vistas a uma abordagem inovadora para o tratamento da leishmaniose.

2.2. Objetivos específicos

- Expressar e purificar a enzima tripanotiona redutase recombinante de *L. braziliensis* em *Escherichia coli* para posterior análise da interação com anticorpos VHH.
- Expressar e purificar os clones de anticorpos de domínio único (VHH) anti-rTRLb para avaliação de sua reatividade com a enzima alvo.
- Obter os perfis eletroforéticos das proteínas purificadas em SDS-PAGE 12,5%.
- Avaliar a interação dos anticorpos VHH à rTRLb por meio de técnicas imunoenzimáticas como *Dot blot* e ELISA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos relacionados à qualidade e biossegurança seguirão as normas vigentes e estarão em conformidade com o Certificado de Qualidade e Biossegurança (CQB) 526/20 da Fiocruz Ceará.

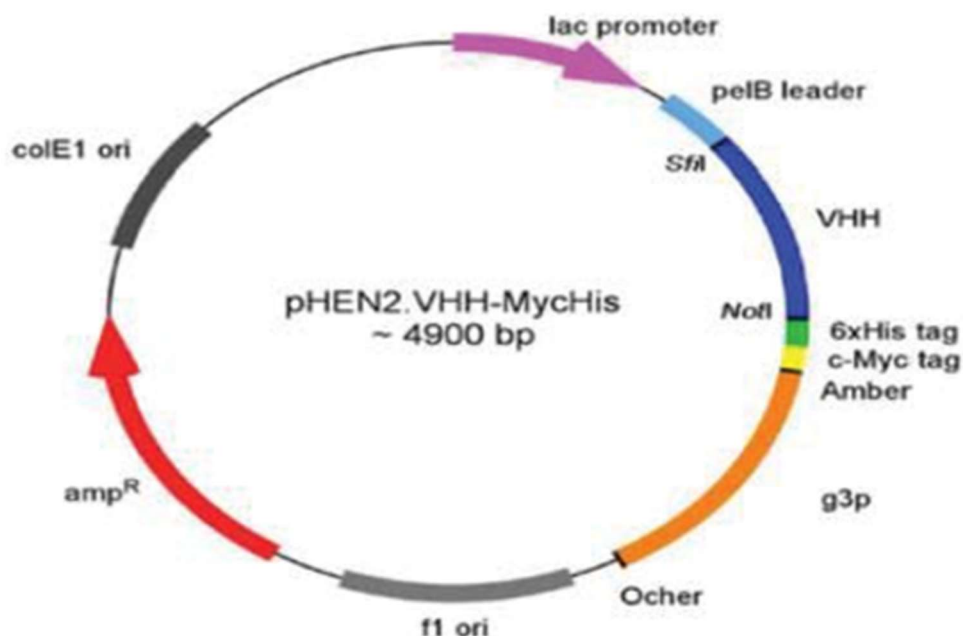
3.1. Expressão e purificação da tripanotiona redutase recombinante de *L. braziliensis* (rTRLb)

Uma cepa de *E. coli* BL21 clonada com o vetor de expressão pET 28 (a+), com o gene da tripanotiona redutase de *L. braziliensis*, foram semeadas em meio LB-ágar (Luria Bertani com ágar) acrescido de 25 µg/mL de canamicina e cultivadas a 37 °C *overnight*, a fim de se obter colônias isoladas. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB com 25 µg/mL de canamicina e cultivada sob agitação orbital de 230 rpm a 37 °C. O pré-inóculo foi adicionado em 500 mL de meio LB com 25 µg/mL de canamicina e cultivada sob agitação orbital de 230 rpm a 37 °C até OD_{600 nm} de 0,8. A indução da expressão foi realizada com a adição de 1 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) (Sigma-Aldrich) por 4 h, a 230 rpm e 37 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado a 3000 xg por 10 min a 4 °C, o *pellet* bacteriano foi ressuscitado em tampão Tris (tris hidroximetil aminometano) pH 8,0 com 1 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich), seguido por incubação de 1 hora a 4 °C. Após, as células passaram por sonicação (Q Sonica, Modelo CL-188) por 30 min, amplitude 30 por 30 segundos *on* e 30 segundos *off*. O lisado foi centrifugado a 10000 xg por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e adicionado a 3 mL de resina de níquel Ni-NTA (ácido nitrilotriacético de níquel, His-link, Promega), previamente equilibrada em tampão 50 mM de fosfato de sódio bibásico, 300 mM de cloreto de sódio e 20 mM de imidazol, pH 8,0, e incubada por 1 hora a 4 °C. As lavagens foram realizadas com duas concentrações de imidazol (20 mM e 40 mM) até OD_{280 nm} de aproximadamente 0. Após as etapas de lavagem, a rTRLb foi eluída com tampão 50 mM de fosfato de sódio bibásico, 300 mM de cloreto de sódio e 300 mM de imidazol, pH 8,0. As frações proteicas coletadas foram submetidas a diafiltração em filtro de 30 kDa (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Milipore®*), para retirada de imidazol e substituição por tampão 40 mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico) e 1 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético), pH 7,5.

3.2. Expressão e purificação de clone de VHH anti-rTRLb

A expressão dos clones de VHH anti-rTRLb (3RT01, 3RT02, 3RT09 e 3RT10), previamente selecionados por *Phage Display* em nosso laboratório, foi feita em cepa de *E. coli* HB2151 contendo o vetor pHEN-2 em 250 mL de meio TB (*Terrific Broth*) acrescido de 0,1% de glicose e 100 µg/mL de carbenicilina, sob agitação orbital de 230 rpm a 37 °C até OD_{600 nm} de 0,9. Posteriormente, foi adicionado 250 mL de meio TB com 100 µg/mL de carbenicilina e 1 mM de IPTG (Sigma-Aldrich) por 16 horas a 30 °C para indução da expressão. As etapas de centrifugação, lise e purificação foram realizadas de acordo com o item 3.1.

Figura 9 - Esquema do vetor fagomídeo pHEN2.



Fonte: LACREU *et al.* (2014). Este vetor de expressão tem origem de replicação em *E. coli* e em M13. Aqui está representado um VHH que será expresso como uma proteína de fusão juntamente com a proteína III da cápside do fago.

3.3. SDS-PAGE

O padrão proteico da rTRLb e dos clones de VHH anti-rTRLb foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, sob condições redutoras e desnaturantes. As amostras foram preparadas em tampão contendo β-mercaptoetanol, glicerol e azul de bromofenol, incubadas em banho seco a 100 °C por 10 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 12,5%. A corrida eletroforética foi realizada utilizando a voltagem fixa de 120 V por 1 hora e 40 minutos. O gel foi corado em solução de 0,5 % de *Coomassie Brilliant Blue*

(R-250), 20% de ácido acético e 40% de metanol e descorada em solução 20% de ácido acético e 40% de metanol. O marcador *TrueColor High Range Protein Marker* (Sinapse®) foi utilizado para verificação do peso molecular das proteínas.

3.4. Dot blot

Em uma membrana de nitrocelulose foram pipetados 3 µL de rTRLb, seguido de incubação com PBSM 1% (PBS com leite) de 1 hora. Após etapa de lavagem com PBST 0,05% (PBS com Tween 20), a membrana foi incubada com os VHHs anti-rTRLb diluídos 1:200 (v/v, anticorpo:PBST 0,05%) sob agitação orbital por 1 hora. A etapa de lavagem foi repetida e seguiu-se com incubação com anticorpo *MonoRab™ Rabbit anti-camelid* VHH HRP a 1:5000, v/v (anticorpo:PBST) por 1 hora sob agitação orbital e abrigo da luz. Após lavagem, a revelação foi realizada utilizando o substrato Pierce™ ECL *Western Blotting* (Thermo Fisher Scientific).

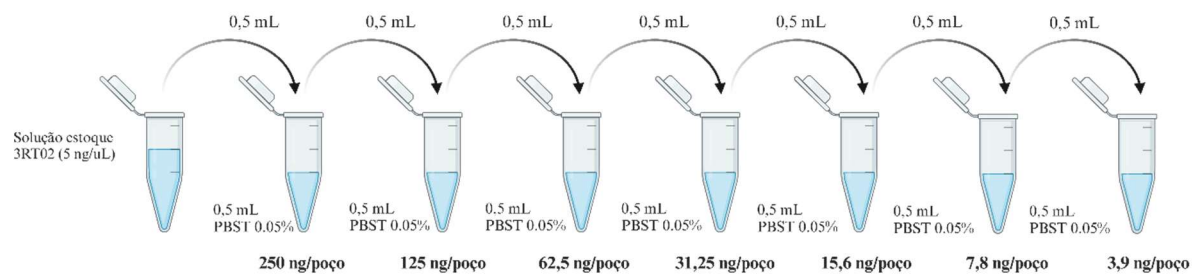
Foi realizado um ensaio, no qual os clones de VHH anti-rTRLb foram pipetados na membrana de celulose, seguido da incubação com PBSM 1%. A detecção foi realizada com *MonoRab™ Rabbit anti-camelid* VHH HRP a 1:5000, v/v (anticorpo:PBST) e revelação com substrato Pierce™ ECL *Western Blotting* (Thermo Fisher Scientific).

3.5. Imunorreatividade do clone por ELISA

Em uma placa de fundo chato (*Immuno 96 MicroWell® Plates*) foram adsorvidos 1 µg de rTRLb por poço durante 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem dos poços com PBST 0,05%, foi realizado o bloqueio das interações inespecíficas com PBSM 1% *overnight*. A placa foi novamente lavada e adicionou-se 100 µL das diluições do clone 3RT02 (Figura 9), seguido por incubação de 1 hora. O VHH foi marcado após incubação da placa com 100 µL/poço do anticorpo *MonoRab™ Rabbit anti-camelid* VHH HRP a 1:12000, v/v (anticorpo:PBST). A detecção foi realizada utilizando TMB (3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina) como substrato para a peroxidase por 30 minutos, e a parada da reação com solução de ácido sulfúrico 0,32 M. Os valores de absorbância a 450 nm foram medidos em uma Leitora de microplacas LMR-96i (Loccus®).

As amostras foram testadas em triplicata e o controle negativo utilizado foi PBST 0,05%. Os dados foram tabulados e o ponto de corte foi definido: $[3 \times \text{desvio padrão} + 3 \times \text{média controle negativo}]$.

Figura 10 - Representação esquemática da diluição do clone 3RT02.



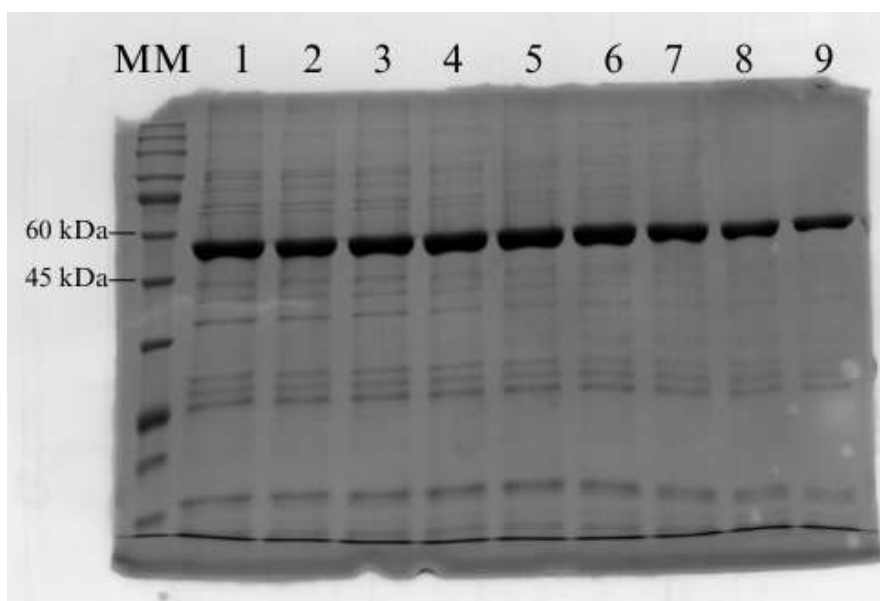
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Expressão e purificação da enzima rTRLb

O protocolo de expressão seguiu a metodologia descrita e padronizada por GARAY, (2018), portanto, escolheu-se não coletar as alíquotas de T0 e T4 (antes da indução da expressão e fim da expressão, respectivamente). Após o crescimento bacteriano, indução, lise e purificação do lisado bacteriano, as frações proteicas foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5%. Foi possível observar bandas correspondentes ao peso molecular da enzima tripanotiona redutase, 54 kDa, na presença do agente redutor (Figura 10).

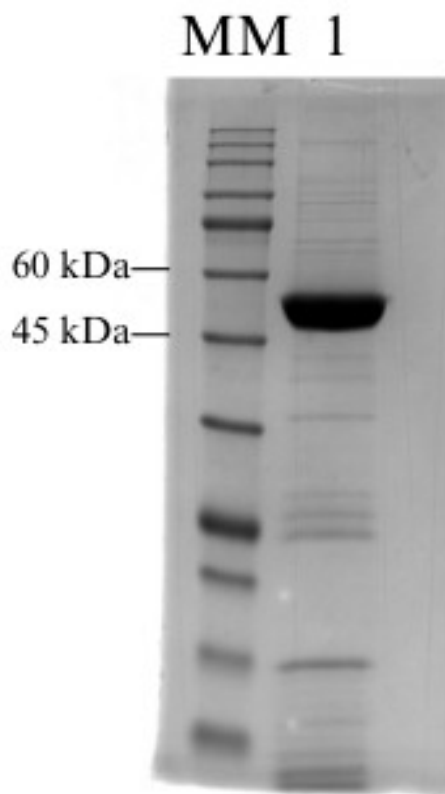
Figura 11 - Perfil eletroforético da enzima rTRLb purificada.



Fonte: Elaborado pelo autor. MM: marcador molecular *TrueColor High Range Protein Marker* (Sinapse®). 1 a 9: frações proteicas advindas do processo de purificação.

Com a confirmação da eletroforese, as frações proteicas que apresentaram as bandas na altura de 54 kDa passaram pelo processo de diafiltração, a fim de se retirar o imidazol e realizar a troca para o tampão de atividade da enzima. Foi realizada uma nova eletroforese para verificar novamente a presença da rTRLb (Figura 11).

Figura 12 - Perfil eletroforético da enzima rTRLb após diafiltração.



Fonte: Elaborado pelo autor. MM: marcador molecular *TrueColor High Range Protein Marker* (Sinapse®). 1: frações proteicas advindas de diafiltração.

É possível calcular o rendimento médio do processo de expressão recombinante de rTRLb, ao substituir o valor de absorbância medido após a diafiltração e o coeficiente de extinção molar da enzima na Lei de Lambert-Beer. O rendimento calculado foi de aproximadamente 8,75 mg/L, sendo cerca de 2 vezes menor do que o observado por GARAY, (2018), apesar de serem utilizadas as mesmas condições de expressão. O rendimento menor pode ser explicado pela diferença no passo de cromatografia, já que a utilizada pela autora foi automatizada. Entretanto, o rendimento foi maior que o apresentado por NUNES, (2011), isso pode ter ocorrido pela diferença do vetor de expressão utilizado e pela condição de expressão.

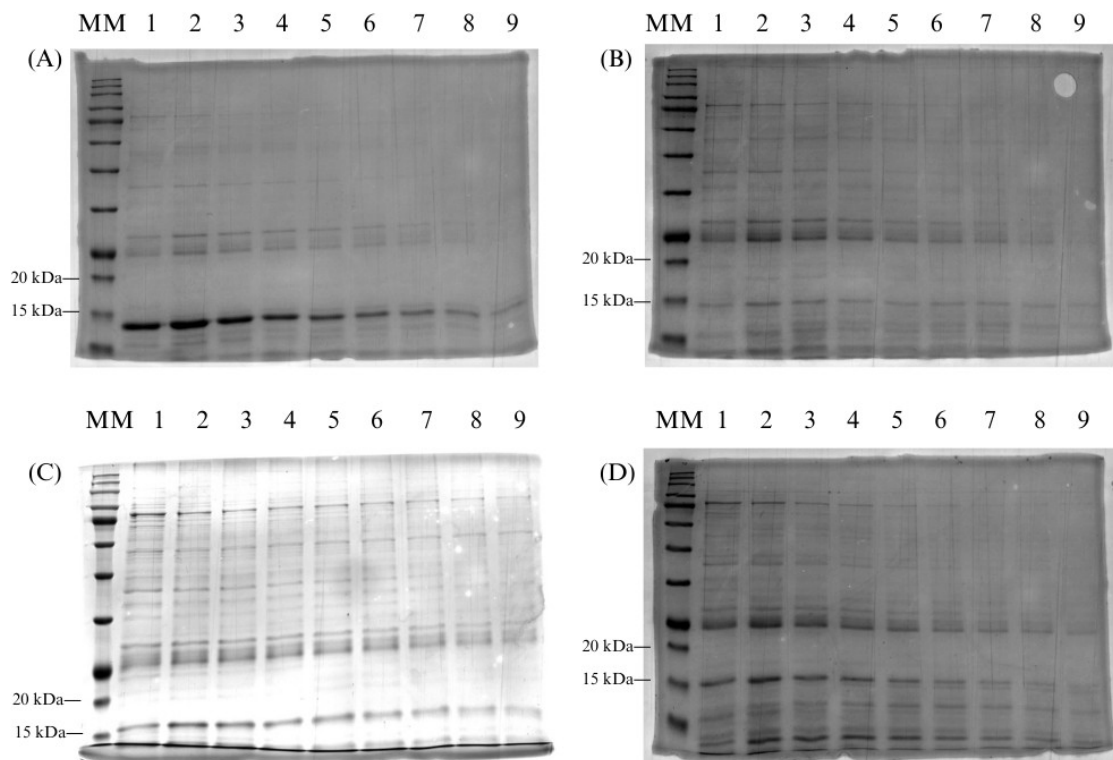
A utilização de *E. coli* para a expressão recombinante de tripanotona redutase de diferentes espécies da família do tripanossomatídeos, como *T. cruzi*, *T. congolense*, *L. dovani* e *L. amazonensis* é relatada na literatura (BORGES *et al.*, 1995; CASTRO-PINTO *et al.*, 2008; MITTAL *et al.*, 2005; SULLIVAN; SHAMES; WALSH, 1989). A escolha da plataforma de expressão procariota dá-se principalmente pela facilidade de manipulação e pela produção de quantidades significativas da proteína, que permite ensaios subsequentes.

4.2. Expressão e purificação de VHHs anti-rTRLb

O vetor de expressão pHEN-2 é fagomídeo, derivado de fagos filamentosos e que contém origem de replicação de um plasmídeo. Dentre os componentes principais, o códon âmbar permite que as proteínas sejam expressas de forma solúvel, não fusionada ao capsídeos do fago (QI *et al.*, 2012). Para a expressão dos VHHs de forma solúvel é necessário utilizar cepas não supressoras do códon âmbar, portanto a escolha da cepa HB2151. Além disso, a presença de um promotor de lactose permite a indução da expressão por IPTG, garantindo a modulação da produção dos VHHs.

Assim como na obtenção de rTRLb, a obtenção dos VHHs anti-rTRLb seguiu a metodologia padronizada por SANTOS, (2024). Posterior as etapas descritas pelo item 3.2, as frações advindas do processo de purificação dos clones 3RT01, 3RT02, 3RT09 e 3RT10 foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%. Foi possível observar bandas referentes a 15 kDa nos géis dos quatro clones (Figura 12). Percebe-se a presença de muitos contaminantes nos géis de todos os clones, que para as etapas propostas no presente trabalho não prejudicaram os resultados. Entretanto, para perspectivas de tratamento ou diagnóstico são necessários altos graus de pureza a fim de seguir com testes para aprovação regulatória, como prova de conceito, testes pré-clínicos e clínicos (SÁNCHEZ-TRASVIÑA *et al.*, 2021).

Figura 13 - Perfil eletroforético dos clones de VHH anti-rTRLb.



Fonte: elaborado pelo autor. (A) perfil eletroforético do clone 3RT01 após purificação, MM: marcador molecular *TrueColor High Range Protein Marker* (Sinapse®), 1-9: frações proteicas advindas do processo de cromatografia. (B) perfil eletroforético do clone 3RT02 após purificação, MM: marcador molecular *TrueColor High Range Protein Marker* (Sinapse®), 1-9: frações proteicas advindas do processo de cromatografia. (C) perfil eletroforético do clone 3RT09 após purificação, MM: marcador molecular *TrueColor High Range Protein Marker* (Sinapse®), 1-9: frações proteicas advindas do processo de cromatografia. (D) perfil eletroforético do clone 3RT10 após purificação, MM: marcador molecular *TrueColor High Range Protein Marker* (Sinapse®), 1-9: frações proteicas advindas do processo de cromatografia.

Após o processo de diafiltração, os conteúdos foram quantificados por espectrofotometria a 280 nm. O clone 3RT01 apresentou uma concentração de 0,66 mg/mL, 3RT02 de 0,4 mg/mL, 3RT09 de 0,47 mg/mL e 3RT10 de 0,46 mg/mL, porém em diferentes volumes.

A utilização de *E. coli* para produção de proteínas recombinantes possui uma boa relação custo-benefício e facilidade de manipulação genética. No entanto, os processos cromatográficos apresentam diversos desafios, principalmente em relação a contaminantes. O lisado advindo dessa bactéria pode reduzir a eficiência da cromatografia com metais imobilizados (IMAC), necessitando de etapas adicionais para remover os contaminantes (GOMEZ-LUGO *et al.*, 2021; MAGNUSDOTTIR *et al.*, 2009). Esse fato, explica a presença de diversas bandas nos géis dos clones, o que evidencia a necessidade de inclusão de outra etapa de cromatografia.

4.3. Reatividade dos VHH frente rTRLb

Como observado por SANTOS, (2024), os clones não reconhecem a enzima rTRLb desnaturada, assim foi realizado um *Dot blot* para verificar se os VHHs estavam reconhecendo o seu antígeno. Nas condições testadas, apenas o clone 3RT02 liga-se a rTRLb. Porém, esses clones são advindos de um trabalho anterior, no qual todos os VHHs anti-rTRLb tiveram a sua capacidade de ligação e reatividade ao alvo testadas. No presente trabalho, utilizou-se o anticorpo de detecção *MonoRab™ Rabbit anti-camelid VHH HRP* diferente do utilizado por SANTOS, (2024), esse fato poderia explicar a ausência de ligação dos outros clones.

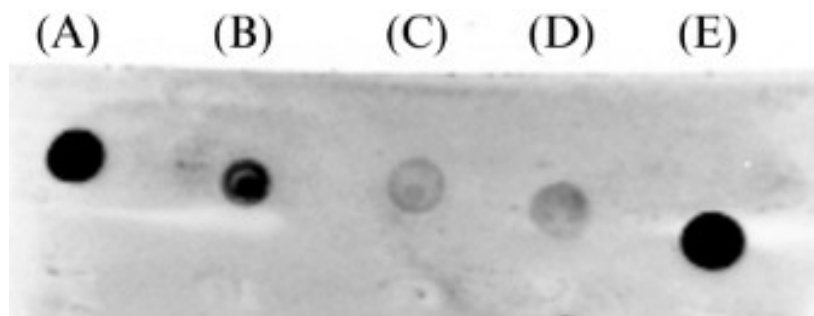
Figura 14 - Imunorreatividade do clones de VHH anti-rTRLb por *Dot blot*.



Fonte: elaborado pelo autor. (A) 3RT01, (B) 3RT02, (C) 3RT09, (D) 3RT10. TR: tripanotona redutase recombinante de *L. braziliensis*, CP: controle positivo.

Com a finalidade de verificar se o *MonoRab™ Rabbit anti-camelid VHH HRP* possuiria a capacidade de detectar todos os clones, realizou-se um novo *Dot blot*, no qual os clones foram pipetados na membrana. Observou-se que todos os clones foram detectados, porém em intensidades diferentes, como foi utilizada a mesma diluição de 1:200 para todos, explica a diferença de intensidade entre 3RT01 e os demais, já que ele está em maior concentração (Figura 14). Contudo, a diferença de concentração dos clones não explica uma maior intensidade do clone 3RT02, que apresenta menor concentração.

Figura 15 - Detecção dos clones de VHH anti-rTRLb por *Dot blot*.

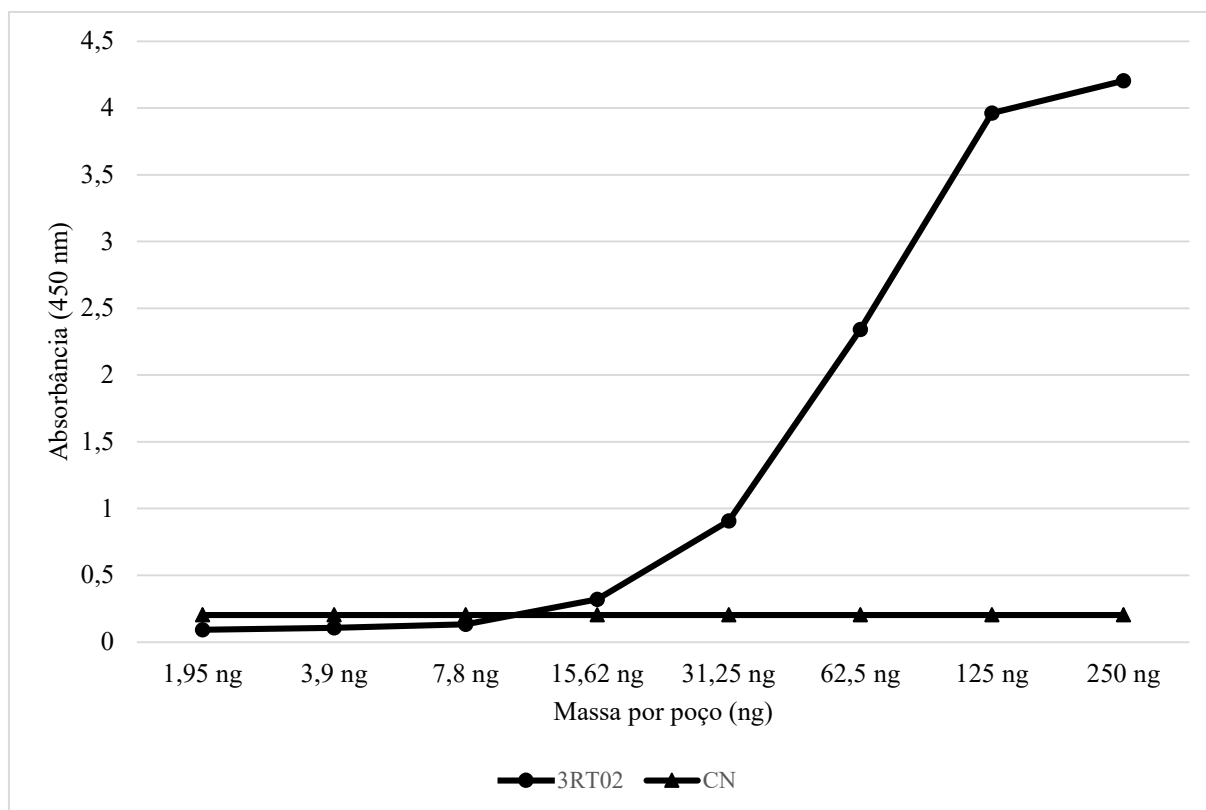


Fonte: elaborado pelo autor. (A): 3RT01, (B): 3RT02, (C) 3RT09, (D) 3RT10 e (E): controle positivo.

As regiões de *Framework* dos anticorpos de domínio único são mais conservadas tanto em quantidade de aminoácidos quanto em sequência se comparadas com as regiões de CDR. Dentre as 4 regiões FR, as mais constantes são as FR1, com uma média de 84% de conservação, e FR4, com 90% (MELARKODE VATTEKATTE *et al.*, 2020). Portanto, é possível inferir que o anticorpo anti-VHH utilizado para o ELISA deve ter como epítipo FR1 ou FR4, devido a sua conservação de sequência. Apesar do alto grau de semelhança entre as regiões de FR nos VHHs, essas regiões possuem uma alta variação em suas conformações. FR1 e FR4 possuem apenas 40% e 38%, respectivamente, uma representatividade de padrão estrutural entre diversos VHHs (NOËL; MALPERTUY; DE BREVERN, 2016; VATTEKATTE *et al.*, 2023). Portanto, a diferença de marcação e detecção no *Dot blot* pode ser pela existência natural de uma conformação diferente entre os clones ou pela expressão em uma conformação diferente pela bactéria. Seriam necessários conhecer os padrões de inflexão de cada clone para descobrir qual das duas hipóteses está correta.

A partir dos resultados do ensaio de *Dot blot*, escolheu-se apenas o clone 3RT02 para ser utilizado no ELISA. Analisando o gráfico 1, percebe-se um aumento progressivo na resposta conforme a concentração de VHH aumenta, o que indica que a interação entre 3RT02 e rTRLb é dose-dependente. A resposta começa a ser detectada a partir de 15,62 ng e torna-se mais evidente em 31,25 ng. O sinal detectável aumenta rapidamente após a quantidade de 62,5 ng e atinge um platô entre 125 e 240 ng, o que sugere uma saturação dos sítios de ligação disponíveis. Além disso, o controle negativo permanece próximo do zero, confirmando que a resposta não é resultado de interações inespecíficas ou de ruído do sistema.

Gráfico 1 – Imunorreatividade do clone de VHH anti-rTRLb (3RT02) por ELISA.



Fonte: elaborado pelo autor. Eixo x: massa do clone 3RT02 utilizada por poço. Eixo y: valores medidos de absorbância medidos a 450 nm. CN: controle negativo.

Visar a tripanotiona redutase como uma alternativa de tratamento para leishmaniose é extremamente interessante, visto a sua importância para o parasito. Essa enzima é extremamente conservada entre todos os kinetoplastídeos, com uma faixa entre 80 a 100% de homologia e 66 a 100% de identidade entre as sequências. Em relação a glutathiona redutase, o homólogo mais próximo dos humanos existe uma homologia de cerca de 52% e uma identidade de 35% entre as sequências. (ILARI *et al.*, 2018). A partir dos resultados do *Dot blot* e ELISA, percebe-se que os clones de VHH são capazes de se ligar a enzima rTRLb. Não se pode excluir a possibilidade de reatividade cruzada entre a tripanotiona redutase das outras espécies causadoras de leishmaniose, o que seria extremamente importante para o tratamento dessa enfermidade, e de outros tripanossomatídeos. Entretanto, seria necessário verificar reatividade contra a glutathiona redutase para excluir clones que possam ser reativos contra essa enzima humana. Para confirmar isso, poderiam ser realizados ELISA com as TRs de outras espécies do gênero *Leishmania*, e outros tripanossomatídeos e com a glutathiona redutase humana.

Para inibir de forma eficaz a TR são necessários inibidores que reduzam a atividade da enzima em pelo menos 90% e com uma IC_{50} , concentração de uma substância que inibe 50%

da atividade de uma molécula, abaixo do micromolar (KRIEGER *et al.*, 2000; TOVAR *et al.*, 1998). Anticorpos de domínio único com IC₅₀ na faixa de nanomolar já são descritos na literatura (HINZ *et al.*, 2010; STROKAPPE *et al.*, 2019; TORRES *et al.*, 2024), sugerindo que esse formato pode ser usado como um inibidor promissor para a TR, portanto, para o manejo da leishmaniose.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo destaca o potencial dos anticorpos de domínio único (VHHs) como ferramentas promissoras no desenvolvimento de abordagens terapêuticas direcionadas à tripanotona redutase de *Leishmania braziliensis* para o tratamento da leishmaniose. A obtenção e purificação da enzima rTRLb e dos clones de VHH anti-rTRLb (3RT01, 3RT02, 3RT09 e 3RT10) foram bem-sucedidas, com bandas observadas no SDS-PAGE correspondentes a 54 kDa (rTRLb) e 15 kDa (VHH). Dentre os clones de VHH expressos, apenas o 3RT02 demonstrou capacidade de ligação ao alvo nos dois ensaios de *Dot blot* testados, assim, foi o escolhido para o ELISA. No ensaio imunoenzimático, o clone apresentou boa reatividade, com uma interação dose-dependente e uma possível saturação a partir de 125 ng. O início da detecção foi em 15,62 ng, na qual a resposta está maior que o controle negativo, o que mostra que a interação não é devida inespecificidades. Com base nos resultados apresentados, os anticorpos de domínio único podem ser alternativas promissoras para o diagnóstico ou manejo da leishmaniose. Além disso, dada a alta conservação de TR entre espécies de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos, o insumo biotecnológico pode ser explorado para o desenvolvimento de terapias de amplo espectro contra diferentes formas de leishmaniose ou tripanossomiasas. No entanto, para avançar no uso clínico, estudos adicionais são necessários para avaliar a reatividade cruzada com a glutatona redutase humana, garantindo a segurança e especificidade dos clones desenvolvidos. Portanto, esse trabalho contribui para a busca de novos tratamentos para doenças negligenciadas, como a leishmaniose, promovendo o avanço na utilização da Biotecnologia para a saúde humana.

REFERÊNCIAS

ABADIÁS-GRANADO, I. *et al.* Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601–618, jul. 2021.

ALATIF, H. Burden and Trends of Leishmaniasis over the last one Decade Across the Globe: Trend Analysis of WHO Regions. **Integrative Journal of Medical Sciences**, 2021.

ANA FIDELINA GÓMEZ GARAY. **Tripanotiona redutase de Leishmania braziliensis como alvo molecular para prospecção de novos inibidores: Avaliação da LAAO de Crotalus atrox com atividade antiparasitária**. Porto velho: Fundação Oswaldo Cruz - Rondônia, 23 nov. 2018.

ARBABI-GHAHROUDI, M. **Camelid Single-Domain Antibodies: Promises and Challenges as Lifesaving Treatments**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 maio 2022.

BATTISTA, T. *et al.* **Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiasis**. **Molecules** MDPI AG, , 1 abr. 2020.

BELO, V. S. *et al.* Temporal patterns, spatial risks, and characteristics of tegumentary leishmaniasis in Brazil in the first twenty years of the 21st Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 6 June, 2023.

BORGES, A. *et al.* Site-Directed Mutagenesis of the Redox-Active Cysteines of Trypanosoma cruzi Trypanothione Reductase. **European Journal of Biochemistry**, v. 228, n. 3, p. 745–752, mar. 1995.

BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA, K. **An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases**. **Frontiers in Chemistry** Frontiers Media S.A., , 12 mar. 2021.

CASTRO-PINTO, D. B. *et al.* Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World Leishmania species. **Archives of Microbiology**, v. 189, n. 4, p. 375–384, 5 abr. 2008.

CECÍLIO, P. *et al.* **Deception and manipulation: The arms of Leishmania, a successful parasite**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 2014.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. **Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites**. **Communications Biology** Nature Research, , 1 dez. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC - DPDx - Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 7 jan. 2025.

COSTA, C. H. N. *et al.* **From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis**. **Pathogens** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1

jul. 2023.

COSTA-DA-SILVA, A. C. *et al.* Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 4, p. 54, 31 mar. 2022.

DE CASTRO NETO, A. L.; DA SILVEIRA, J. F.; MORTARA, R. A. **Comparative Analysis of Virulence Mechanisms of Trypanosomatids Pathogenic to Humans**. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**Frontiers Media S.A., , 16 abr. 2021.

DE VRIES, H. J. C.; SCHALLIG, H. D. **Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments**. **American Journal of Clinical Dermatology**Adis, , 1 nov. 2022.

ESKIER, N. E. *et al.* Physicochemical differences between camelid single-domain antibodies and mammalian antibodies. **Turkish Journal of Biology**, v. 47, n. 6, p. 423–436, 2023.

FERNANDES, C. F. C. *et al.* **Engineering of single-domain antibodies for next-generation snakebite antivenoms**. **International Journal of Biological Macromolecules**Elsevier B.V., , 31 ago. 2021.

FIGUEIREDO, A. B. DE; SOUZA-TESTASICCA, M. C.; AFONSO, L. C. C. **Purinergic signaling and infection by Leishmania: A new approach to evasion of the immune response [figure presented]**. **Biomedical Journal**Elsevier B.V., , 1 ago. 2016.

FRIDY, P. C.; ROUT, M. P.; KETAREN, N. E. **Nanobodies: From High-Throughput Identification to Therapeutic Development**. **Molecular and Cellular Proteomics**American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 1 dez. 2024.

GOMEZ-LUGO, J. J. *et al.* Expression and Purification of Recombinant Proteins in Escherichia coli Tagged with the Metal-Binding Proteins SmbP and CusF3H⁺. Em: [s.l: s.n.]. p. 329–344.

GONZÁLEZ-MONTERO, M. C. *et al.* **Targeting Trypanothione Metabolism in Trypanosomatids**. **Molecules**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 maio 2024.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. Em: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2013. v. 82p. 155–184.

HAMERS-CASTERMAN, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, v. 363, n. 6428, p. 446–448, jun. 1993.

HINZ, A. *et al.* Crystal Structure of the Neutralizing Llama VHH D7 and Its Mode of HIV-1 gp120 Interaction. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10482, 5 maio 2010.

HORN, D. A profile of research on the parasitic trypanosomatids and the diseases they cause. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 1, 2022.

ILARI, A. *et al.* Toward a Drug Against All Kinetoplastids: From LeishBox to Specific and Potent Trypanothione Reductase Inhibitors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 3069–

3078, 6 ago. 2018.

JIN, B. K. *et al.* **NANOBODIES®: A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications.** *International Journal of Molecular Sciences* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 mar. 2023.

KIM, J. *et al.* **Nanobodies: Robust Miniprotein Binders in Biomedicine.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X23000418>>.

KRIEGER, S. *et al.* Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology*, v. 35, n. 3, p. 542–552, 5 fev. 2000.

KUMARI, D. *et al.* **Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics: An update.** *European Journal of Pharmacology* Elsevier B.V., , 5 nov. 2021.

KURODA, D.; TSUMOTO, K. Structural Classification of CDR-H3 in Single-Domain VHH Antibodies. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2023. v. 2552p. 61–79.

LACREU, M. *et al.* Obtención de fragmentos de anticuerpos de llama dirigidos contra antígenos tumorales de melanoma metastásico. In: **Informes finales - Segunda cohorte. Becarios de Formación Inicial en Investigación en cáncer (2012-2013).** [s.l.] Instituto Nacional del Cáncer, 2014. p. 96–101.

LOPEZ CARDOSO, F. M. *et al.* Single Domain Camelid Antibodies that Neutralize Negative Strand Viruses. Em: **Antiviral Drugs - Aspects of Clinical Use and Recent Advances.** [s.l.] InTech, 2012.

MACHADO MARINHO, A. C. *et al.* **The role of venom proteomics and single-domain antibodies for antivenoms: Progress in snake envenoming treatment.** *Drug Discovery Today* Elsevier Ltd, , 1 maio 2024.

MAGNUSDOTTIR, A. *et al.* Enabling IMAC purification of low abundance recombinant proteins from E. coli lysates. *Nature Methods*, v. 6, n. 7, p. 477–478, jul. 2009.

MANN, S. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Current Tropical Medicine Reports*, v. 8, n. 2, p. 121–132, 17 jun. 2021.

MARINHO-JÚNIOR, J. F. *et al.* High levels of infectiousness of asymptomatic Leishmania (Viannia) braziliensis infections in wild rodents highlights their importance in the epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 17, n. 1, 30 jan. 2023.

MELARKODE VATTEKATTE, A. *et al.* Discrete analysis of camelid variable domains: sequences, structures, and in-silico structure prediction. *PeerJ*, v. 8, p. e8408, 6 mar. 2020.

MITTAL, M. K. *et al.* Expression, purification, and characterization of Leishmania donovani trypanothione reductase in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, v. 40, n. 2, p. 279–286, abr. 2005.

MUYLDERMANS, S. Applications of Nanobodies. v. 19, p. 21, 2025.

NOËL, F.; MALPERTUY, A.; DE BREVERN, A. G. Global analysis of VHHs framework regions with a structural alphabet. **Biochimie**, v. 131, p. 11–19, dez. 2016.

NUWANGI, H. *et al.* Stigma associated with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 12, 1 dez. 2023.

OPAS. **LEISHMANIOSES: informe epidemiológico da Região das Américas**. [s.l: s.n.].

PILLAY, T. S.; MUYLDERMANS, S. **Application of single-domain antibodies (“nanobodies”) to laboratory diagnosis**. **Annals of Laboratory Medicine** Seoul National University, Institute for Cognitive Science, , 2021.

PRADHAN, S. *et al.* **Treatment options for leishmaniasis**. **Clinical and Experimental Dermatology** John Wiley and Sons Inc, , 1 mar. 2022.

QI, H. *et al.* Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. **Journal of Molecular Biology**, v. 417, n. 3, p. 129–143, mar. 2012.

REBECA KÖRTING NUNES. **CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ENZIMA TRIPANOTONA REDUTASE DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE CHALCONAS**. Florianópolis: [s.n.].

REIS, E. S. DOS *et al.* Spatial and temporal modeling of the global burden of Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: A 21-year ecological study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 18, n. 11, p. e0012668, 1 nov. 2024.

SAMANT, M. *et al.* **Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis**. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** Frontiers Media S.A., , 18 fev. 2021.

SÁNCHEZ-TRASVIÑA, C. *et al.* **Purification of Modified Therapeutic Proteins Available on the Market: An Analysis of Chromatography-Based Strategies**. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** Frontiers Media S.A., , 20 ago. 2021.

SANTI, A. M. M.; MURTA, S. M. F. Antioxidant defence system as a rational target for Chagas disease and Leishmaniasis chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.

SANTOS, V. M. B. DOS. **DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS DE DOMÍNIO ÚNICO ANTI-TRIPANOTONA REDUTASE COM VISTAS AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**. [s.l: s.n.].

SCARPINI, S. *et al.* **Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics**. **Microorganisms** MDPI, , 1 out. 2022.

SERAFIM, T. D. *et al.* Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology**, v. 37,

n. 11, p. 976–987, nov. 2021.

STEFANO ZINEDDU *et al.* ESI MS Studies Of T. brucei Trypanothione Reductase And Its Reactions With Selected Metal Compounds. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 14 out. 2024.

STROKAPPE, N. M. *et al.* Super Potent Bispecific Llama VHH Antibodies Neutralize HIV via a Combination of gp41 and gp120 Epitopes. **Antibodies**, v. 8, n. 2, p. 38, 18 jun. 2019.

SULLIVAN, F. X.; SHAMES, S. L.; WALSH, C. T. Expression of Trypanosoma congolense trypanothione reductase in Escherichia coli: overproduction, purification, and characterization. **Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 4986–4992, 13 jun. 1989.

SUNDAR, S. *et al.* **Current and emerging therapies for the treatment of leishmaniasis. Expert Opinion on Orphan Drugs** Taylor and Francis Ltd., , 2024.

TANG, H.; GAO, Y.; HAN, J. **Application Progress of the Single Domain Antibody in Medicine. International Journal of Molecular Sciences** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 fev. 2023.

TIWARI, N.; TANWAR, N.; MUNDE, M. **Molecular insights into trypanothione reductase-inhibitor interaction: A structure-based review. Archiv der Pharmazie** Wiley-VCH Verlag, , 1 jun. 2018.

TORRES, J. E. P. *et al.* **Allosteric inhibition of trypanosomatid pyruvate kinases by a camelid single-domain antibody.** , 21 ago. 2024. Disponível em: <<https://elifesciences.org/reviewed-preprints/100066v1>>

TOVAR, J. *et al.* Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: Effect on parasite intracellular survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 9, p. 5311–5316, 28 abr. 1998.

VATTEKATTE, A. M. *et al.* General Trends of the Camelidae Antibody VHHs Domain Dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4511, 24 fev. 2023.

VÁZQUEZ, K. *et al.* Trypanothione Reductase: A Target for the Development of Anti-Trypanosoma cruzi Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, 17 mar. 2017.

YU, T. *et al.* **Single domain antibody: Development and application in biotechnology and biopharma. Immunological Reviews** John Wiley and Sons Inc, , 1 nov. 2024.