

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde Infectologia e Medicina Tropical

ÁQUILA SERBATE BORGES PORTELA

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS DE
Leishmania spp. SOB A FORMA DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES COMO
MARCADORES IMUNOLÓGICOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Belo Horizonte
2019

Áquila Serbate Borges Portela

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS DE *LEISHMANIA spp.* SOB A FORMA DE
ANTÍGENOS RECOMBINANTES COMO MARCADORES IMUNOLÓGICOS
NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Versão final

Tese apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor junto ao referido Programa.

Orientadora: Professora Regina Lunardi
Rocha

Co-orientadores: Professor Manoel Otávio
da Costa Rocha Professor
Eduardo Antonio Ferraz
Coelho

Belo Horizonte
2019

P843a Portela, Áquila Serbate Borges.
Avaliação de proteínas de leishmania spp. sob a forma de antígenos recombinantes como marcadores imunológicos na leishmaniose visceral. / Áquila Serbate Borges Portela. -- Belo Horizonte: 2019. 67f.: il.
Orientador (a): Regina Lunardi Rocha.
Coorientador (a): Manoel Otávio da Costa Rocha ; Eduardo Antonio Ferraz Coelho.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leucócitos Mononucleares. 2. Citocinas. 3. Anticorpos. 4. Proteínas Recombinantes. 5. Imunidade nas Mucosas. 6. Leishmaniose Visceral. 7. Dissertação Acadêmica. I. Rocha, Regina Lunardi. II. Rocha, Manoel Otávio da Costa. III. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WC 715

Bibliotecário responsável: Fabiene Letizia Alves Furtado CRB-6/2745



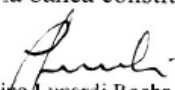
FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LEISHMANIA spp. SOB A FORMA DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES COMO MARCADORES IMUNOLÓGICOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL

ÁQUILA SERBATE BORGES PORTELA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, área de concentração INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.


Aprovada em 07 de maio de 2019, pela banca constituída pelos membros:

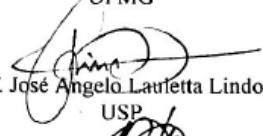

Prof. Regina Lunardi Rocha - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho
UFMG


Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha
UFMG


Prof. Maria Auxiliadora Parreiras Martins
UFMG


Prof. Vinicio Tadeu da Silva Coelho
UFMG


Prof. José Angelo Lauffetta Lindoso
USP


Prof. Alexandre Sobreira Galdino
UFSJ

Belo Horizonte, 7 de maio de 2019.

Ao meu filho Francisco, por tornar meus dias mais felizes e me motivar a seguir em frente.

Ao meu amigo e esposo Davi, pelo apoio e dedicação. Aos meus pais Maria Alda Serbate e Sebastião Martins Borges (*in memoriam*), por todos os ensinamentos e incentivo. Aos pacientes que participaram do estudo.

AGRADECIMENTOS

Projetos relevantes precisam de uma equipe engajada na sua realização, o que não foi diferente com o presente projeto, portanto devo meus sinceros agradecimentos a todos envolvidos em sua realização e também àqueles de forma indireta me auxiliaram na sua execução.

Ao co-orientador Professor Doutor Eduardo Antônio Ferraz Coelho, pela extrema dedicação ao desenvolvimento do projeto e orientação na realização dos experimentos, sem tal apoio seria inviável a execução desta pesquisa.

A orientadora Professora Doutora Regina Lunardi Rocha por estar sempre disposta a auxiliar e pelo o apoio e acolhimento.

Ao co-orientador Professor Doutor Manoel Otávio da Costa Rocha pelos ensinamentos e pela confiança e acolhimento.

À professora Rachel Basques Caligiorne e aos colaboradores do laboratório de Micologia do Instituto de Ensino e Pesquisa do Grupo Santa Casa de Belo Horizonte, pela colaboração no desenvolvimento do estudo.

Aos membros do Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Lourena, Fernanda, Beatriz, Thais, Mariana, Gabriela, Daniela Pagliara e Daniela Rossetti pela imensa ajuda, sem vocês nada disso seria possível.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e ao Centro de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical.

Aos médicos da Santa Casa de Belo Horizonte que auxiliaram no recrutamento dos pacientes. Aos gestores do Grupo Santa Casa de BH pelo apoio cedido.

À Nossa Senhora Aparecida.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AUC	<i>Area under the curve</i> (Área Sobre a Curvar)
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
CO ₂	Dióxido de carbono
DAT	Teste de aglutinação direta
DO	Densidade óptica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fig.	Figura
GBP	Proteína de ligação GBP
h	Hora
H ₂ O ₂	Água oxigenada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HAI	Chagatest hemagglutination inhibition
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HRF	(<i>IgE- dependente histamine-releasing fator</i>)- Fator de liberação de histamina dependente de IgE
IC	Intervalo de confiança
ICT	Teste imunocromatográfico
IFAT	Ensaio de Imunofluorescência indireta
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina G subtipo 1
IgG2	Imunoglobulina G subtipo 2
IgG3	Imunoglobulina G subtipo 3
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-12	Interleucina 12
IL-22	Interleucina 22
IL-6	Interleucina 6
INF-γ	Interferon-gama
kDa	Kilo Daltons
kDNA	DNA do cinetoplasto
kg	Kilograma
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LR	Likelihood ratio
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
mg	Miligrama

min	Minuto
mL	Mililitro
mM	milimolar
µg	micrograma
n	número
N	Normal
nm	Nanômetro
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline with Tween 20</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg	Picograma
PKDL	Leishmaniose dérmica pós-calazar
rA2	Proteína recombinante A2
rBHUP2	Proteína recombinante BHUP2
rGP6	Proteína recombinante GP6
rHRF	Proteína recombinante HRF (Fator de liberação de histamina dependente de IgE)
rHSP70	Proteína recombinante HSP70
rK26	Proteína recombinante K26
rK28	Proteína recombinante K28
rK9	Proteína recombinante K9
rKLO8	Proteína recombinante KLO8
rLepp12	Proteína recombinante Lepp12
rLiHyD	Proteína recombinante LiHyD
rLiHyp6	Proteína recombinante LiHyp6
rLiHyT	Proteína recombinante LiHyT
rLiHyV	Proteína recombinante LiHyV
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
rORFF	Proteína recombinante ORFF
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (característica de operação do receptor)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SDS- PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Se	Sensibilidade
SLA	Extrato proteico solúvel de <i>Leishmania</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Sp	Specificity (especificidade)
TNF-α	Fator de necrose tecidual alfa
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
U	Unidade
USA	<i>United States of America</i>
Valor de P	Probabilidade de significância

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Item	Título	Página
Figura 1	Ciclo biológico da Leishmania: Ciclo de infecção	20
Figura 2	Situação da endemicidade da Leishmaniose Cutânea no mundo em 2015	22
Figura 3	Situação da endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo em 2015	22
Figura 4	Incidência da Leishmaniose Visceral por Unidade Federativa Brasileira nos anos de 2014 e 2015	23
Figura 5	Absorbância após a reação dos anticorpos, presentes em soros de pacientes, com antígenos utilizados	44
Figura 6	Reação das Imunoglobulinas dos subtipos G1 e G2 frente aos antígenos	46
Figura 7	Produção de IFN- γ e IL-10 por PBMC estimuladas por antígenos antes e após o tratamento medicamentoso	47
Figura 8	Produção de IgG total, IgG1, e IgG2 por PBMC após estímulo por antígenos antes e após o tratamento medicamentoso	48
Tabela 1	Avaliação da Sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes	33

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença potencialmente fatal e o tratamento é tóxico e/ou apresenta custo elevado. A proteção contra a infecção pelo parasito *Leishmania* está associada a uma imunidade do tipo Th1, sendo baseada na produção de citocinas como IFN-gama e IL-12 por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) do hospedeiro mamífero. No presente trabalho, cinco proteínas do parasito *Leishmania infantum*, denominadas de fator de liberação de histamina dependente de IgE (HRF) e quatro proteínas hipotéticas (LiHyD, LiHyV, LiHyT e LiHyp6), em suas formas recombinantes, foram utilizadas com o objetivo de se avaliar a resposta celular e humoral específica em amostras de soros e nos sobrenadantes de culturas de PBMCs estimulados coletados de pacientes com LV antes e após o tratamento da doença. Nos resultados obtidos avaliando a resposta celular, quando PBMCs foram estimulados com as proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT, níveis elevados de IFN-gama e uma baixa produção de IL-10 foram observados nos pacientes tratados. Na análise das subclasses de anticorpos, uma maior produção de IgG2 foi encontrada nos pacientes tratados, quando comparados com os níveis obtidos da subclasse IgG1, usando tais proteínas nas placas de ELISA. Adicionalmente, avaliando a eficácia diagnóstica dos antígenos recombinantes, as proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT apresentaram também os melhores valores de sensibilidade e especificidade nos testes sorológicos para identificar os pacientes com LV, assim como eles não foram reconhecidos por anticorpos presentes nos soros de indivíduos não infectados ou daqueles desenvolvendo doenças relacionadas à LV. As proteínas rLiHyV e rLiHyp6 mostraram uma produção mista de IFN-gama e IL-10 e menores valores de sensibilidade e especificidade nos testes sorológicos. Em conclusão, este trabalho apresenta a indicação de que o tratamento e a cura da LV podem estar associados com uma resposta celular do tipo Th1, baseado na produção de IFN-gama e de anticorpos do isotipo IgG2, e denota a possibilidade de utilização das proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT como possíveis biomarcadores de avaliação diagnóstica e de evolução de tratamento da LV.

Palavras-chave: Células mononucleares do sangue periférico; citocinas; anticorpos; proteínas recombinantes; resposta imune; leishmaniose visceral.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a potentially fatal disease, in which treatment is toxic and/or presents high cost. The protection against *Leishmania* infection is associated with the development of Th1-type immunity, being based on the production of cytokines, such as IFN- γ and IL-12, by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the infected mammalian hosts. In the present study, five parasite proteins, namely IgE-dependent histamine releasing factors (HRF) and four hypothetical proteins (LiHyD, LiHyV, LiHyT and LiHyp6), when in their recombinant formats, were used to evaluate the cellular and humoral response developed, by using sera samples and stimulated PBMC culture supernatants from VL patients, before and after the treatment against the disease. In the results obtained evaluating the cellular response, when PBMCs were stimulated with the rHRF, rLiHyD and rLiHyT proteins, higher IFN- γ levels and lower IL-10 production were found in the treated patients. Evaluating the antibody production, a higher production of rHRF, rLiHyD and rLiHyT-specific IgG2 isotype was found in sera from treated patients, when compared to the levels of the IgG1 antibody. Additionally, evaluating the diagnostic efficacy of the recombinant molecules, rHRF, rLiHyD and rLiHyT proteins were those presenting better sensitivity and specificity values in the serological assays to diagnose VL. The rLiHyV and rLiHyp6 proteins showed a mixed production of IFN- γ and IL-10, besides worse results in the serological assays. In conclusion, this work indicates that the evolution of the treatment of VL can be associated with the development of Th1-type cell response, based on the production of IFN- γ , and denotes the potential use of the rHRF, rLiHyD and rLiHyT proteins as possible biomarkers for the diagnostic evaluation and treatment against VL.

Keywords: Peripheral blood mononuclear cells; cytokines; antibodies; recombinant proteins; immune response; visceral leishmaniasis.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	14
2- REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1- A etiologia e o ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i> spp.	18
2.2- Epidemiologia das leishmanioses	20
2.3- Manifestações clínicas da LV humana	23
2.4- Diagnóstico da Leishmaniose visceral	24
2.5- Tratamento da leishmaniose visceral	25
2.6- Medidas de prevenção e controle da leishmaniose visceral	26
2.7- Resposta imune na leishmaniose visceral humana	27
2.8- Proteínas utilizadas no projeto	31
3- OBJETIVOS	33
3.1- Objetivo geral	33
3.2- Objetivos específicos	33
4- MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1- Aspectos éticos	34
4.2- Amostras de sangue	34
4.3- Cálculo amostral	35
4.4- Coleta de sangue para separação de PBMC	35
4.5- Diagnóstico de doença	35
4.5.1- Extração de DNA	36
4.5.2- Reação de PCR convencional	36
4.6- Preparo do extrato proteico solúvel de <i>Leishmania</i>	36
4.7- Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes	36
4.7.1- Proteína recombinante LiHyT	37
4.7.2- Proteínas recombinantes HRF e LiHyP6	37
4.7.3- Proteínas recombinante LiHyV	39
4.7.4- proteína recombinante LiHyD	40
4.8- Cultura de PBMC e avaliação de citocinas	42

4.9- Avaliação da resposta humoral	42
4.10- Análise imunológica de pacientes em tratamento	44
4.11- Avaliação sorológica em pacientes antes e após o tratamento	44
4.12- Análise estatística	44
5- RESULTADOS	46
5.1- Ensaio diagnóstico empregado na identificação de casos de leishmaniose visceral humana	46
5.2- Resposta imune em pacientes com leishmaniose visceral antes e após o tratamento	49
6- DISCUSSÃO	53
7- CONCLUSÃO	57
8- PROPOSIÇÕES	58
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
10- APENDICE I	66
11- APENDICE II	67
12- ANEXO 1	70

1- INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária causada por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, potencialmente fatal quando não tratada, e que ocorre em países tropicais e subtropicais no mundo. A doença é transmitida por vetores sendo, no Brasil, o responsável pela infecção o flebótomo do gênero *Lutzomia*. A espécie *Leishmania donovani* é responsável pela infecção no leste da África e Subcontinente Indiano, enquanto que *Leishmania infantum* é responsável por casos da doença na Europa, Norte da África e América Latina (DESJEUX, 2004).

Cerca de 90% dos casos de LV são registrados na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil, com uma incidência de 500.000 novos casos estimada por ano e cerca de 50.000 óbitos registrados em decorrência da LV (ALVAR et al., 2012; WHO, 2016). No Brasil, em 2017, ocorreram 4.103 casos (notificados) de LV com 327 óbitos, sendo que somente no estado de Minas Gerais ocorreram 750 casos com 99 óbitos. Portanto, nosso estado foi o responsável por 18,28% da incidência de LV em todo o Brasil naquele ano (BRASIL, 2017).

Adicionalmente, diversos países endêmicos para a doença têm relatado casos de resistência dos parasitos aos medicamentos disponíveis. Dessa forma, a detecção precoce, baseada em um diagnóstico preciso, é importante para garantir ao paciente um tratamento adequado e imediato, reduzindo a exposição dos pacientes à toxicidade dos fármacos além de ser uma importante medida de controle da doença, visando à interrupção do ciclo de transmissão do parasito (SRIVASTAVA et al., 2011).

Em áreas endêmicas de LV, indivíduos infectados que não conseguem controlar a multiplicação dos parasitos desenvolvem a forma aguda e fatal da doença, principalmente, quando associada à presença de infecções concomitantes (GONTIJO & MELO, 2004). Entretanto, uma parte significativa de pessoas residentes em áreas endêmicas consegue controlar a multiplicação dos mesmos, permanecendo assintomática em relação à doença (CALDAS et al., 2002). A infecção mais branda pode ser resultado da exposição contínua dos pacientes às picadas dos vetores com exposição de um baixo número de parasitos, sendo que o número de casos assintomáticos é maior do que o de casos agudos da doença em nosso meio. Tal fato pode sugerir que infecções assintomáticas repetidas são comuns em tais áreas, e uma porcentagem significativa dos indivíduos infectados podem desenvolver imunidade e resistência contra o parasito

(CRESCENTE et al., 2009).

Um estudo realizado no Brasil mostrou que 20% dos pacientes infectados por *L. infantum* desenvolvem LV aguda, enquanto que a grande maioria permanece assintomática (BARÃO et al., 2007). Pacientes com LV sintomática apresentam sinais e sintomas clínicos de infecção sistêmica persistente, tais como febre, fadiga, perda de apetite, peso, dentre outros. A presença dos parasitos no sangue infectando células do sistema fagocítico-mononuclear resulta em uma infiltração das células parasitadas em órgãos, tais como fígado, baço, linfonodos e medula óssea. A febre é geralmente associada a calafrios e pode ser intermitente. A fadiga e fraqueza são agravadas pela anemia, que é causada pelo estado inflamatório persistente dos pacientes e, em alguns casos, por hemorragia. Conforme a doença avança, a esplenomegalia tende a se agravar, causando distensão abdominal e dor; no entanto, os achados clínicos são muitas vezes inconclusivos e confundidos com outras doenças de sintomatologia similar à LV, tais como malária, tuberculose, pneumonia, AIDS, dentre outras (SRYVIDIA et al., 2012).

O perfil da resposta imune está relacionado com a manifestação clínica da LV, de forma que indivíduos assintomáticos têm perfil de resposta imune Th1 mais desenvolvido em relação àqueles com LV aguda. Em um estudo realizado com uma coorte contendo quatro grupos de pacientes, foi possível verificar a relação direta entre a presença de títulos elevados de anticorpos anti-rK39 com a manifestação clínica da doença (HASKER et al., 2014). Goto et al. (2014) avaliaram a alteração dos níveis de fator de ativação de linfócitos B em 20 pacientes com LV, 10 com doença de Chagas e 09 indivíduos sadios. Os pacientes com LV apresentaram elevação do valor desse fator 4,3 vezes maior quando comparado ao grupo controle, considerando que o fator de ativação de linfócitos B está envolvido em desordens imunológicas graves.

Além disso, estudos mostraram que pacientes com LV apresentam alteração fenotípica da porção Fc N-glicosilada de moléculas de IgG, que têm função na regulação da resposta imune contra *L. infantum*, quando comparados aos indivíduos assintomáticos (GARDINASSI et al., 2014). Outro estudo foi realizado com 42 pacientes com LV, 30 controles de regiões endêmicas e 10 controles de regiões não endêmicas, tendo sido possível detectar a diminuição na expressão de CD26 em linfócitos T de pacientes com LV, bem como uma diminuição da presença dessa molécula em aspirados da medula óssea dos pacientes. Com a realização do tratamento, observou-se um aumento da expressão de CD26 e na migração dirigida por quimiocinas em tais pacientes, ressaltando

um uma resposta celular contra a infecção (RAI et al., 2012).

Em relação à imunidade humoral, a resposta imune em pacientes da Índia e no Sudão frente à infecção por *L. donovani* foi avaliada, tendo sido observado que pacientes na Índia apresentaram maior resposta humoral anti-*Leishmania* em relação àqueles encontrados no Sudão, sendo essa variação atribuída à desnutrição com deficiência de zinco e, possivelmente, pela diferença de antigenicidade e capacidade de produção de anticorpos específicos aos parasitos. Foi também observado que pacientes com recidiva da doença apresentaram maiores níveis de IgG1 antileishmanial, enquanto pacientes que realizaram tratamento com sucesso apresentaram baixos níveis desse isotipo de anticorpo, sugerindo que menores níveis de IgG1 podem se constituir em um marcador imunológico de cura para a LV (BHATTACHARYYA et al., 2014).

Em um estudo realizado com a participação de 16 pacientes com diagnóstico de LV, foram detectadas alterações laboratoriais sugestivas de doença autoimune decorrente da infecção. Nesses casos, ressaltou-se o título elevado de anticorpos antinucleares e do fator reumatoide (Liberopoulos et al., 2011). Foi também realizada uma coorte com 35 pacientes com LV, 54 pacientes tratados e curados, 27 pacientes com outras doenças, 52 controles que viviam em regiões onde a doença não é endêmica e 147 controles que viviam em regiões onde a LV é endêmica. Nesse estudo, a resposta celular foi avaliada com base na determinação dos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-10, tendo sido detectado que a resposta Th1 foi mais elevada em pacientes tratados e curados, bem como em moradores sadios de áreas endêmicas, o que sugere que a regressão e/ou proteção contra a doença possa estar relacionada com a presença de níveis elevados de citocinas como o IFN- γ . Foi também observado que pacientes com a forma ativa de LV possuem títulos elevados de IL-10, de forma que a medição dos níveis de tal citocina poderia ser utilizada como um marcador imunológico para a doença (SINGH et al., 2012).

Embora tais estudos tenham sido realizados em países nos quais a LV é considerada endêmica, poucos são os dados de associação da resposta celular e humoral utilizando proteínas recombinantes, outras além da rk39, em pacientes com LV em nosso país. Dessa forma, considerando o exposto, torna-se importante a avaliação do perfil da resposta imune de pacientes com LV, antes e após seu tratamento, sendo que tal avaliação poderá auxiliar na aquisição de dados imunológicos associados à melhoria e/ou ao agravamento da doença, bem como na avaliação do perfil de cura. Espera-se, dessa forma, que novos biomarcadores relacionados à melhora ou piora do quadro de

prognóstico da LV possam ser identificados e, posteriormente, utilizados na prática clínica e laboratorial.

Diante do exposto, permanece a necessidade da realização de novos estudos envolvendo antígenos inéditos para testes como alvos diagnósticos e/ou vacinais, sendo possível o uso das proteínas recombinantes detectadas nas formas amastigotas e promastigotas dos parasitos como tais agentes. Embora as proteínas recombinantes LiHyT, LiHyp6, HRF, LiHyV e LiHyD até então não sejam conhecidas ou descritas em *Leishmania*, principalmente aquelas tratadas como hipotéticas, as mesmas apresentaram importância imunológica na LV canina e/ou murina, de forma que tais antígenos foram usados em experimentos de ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliação da resposta humoral da LV, bem como para o estímulo de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) antes e após o tratamento dos pacientes (COELHO et al., 2003; COELHO et. al., 2012; MARTINS et.al., 2015; COELHO et, al., 2016).

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- A etiologia e o ciclo biológico do parasito *Leishmania* spp.

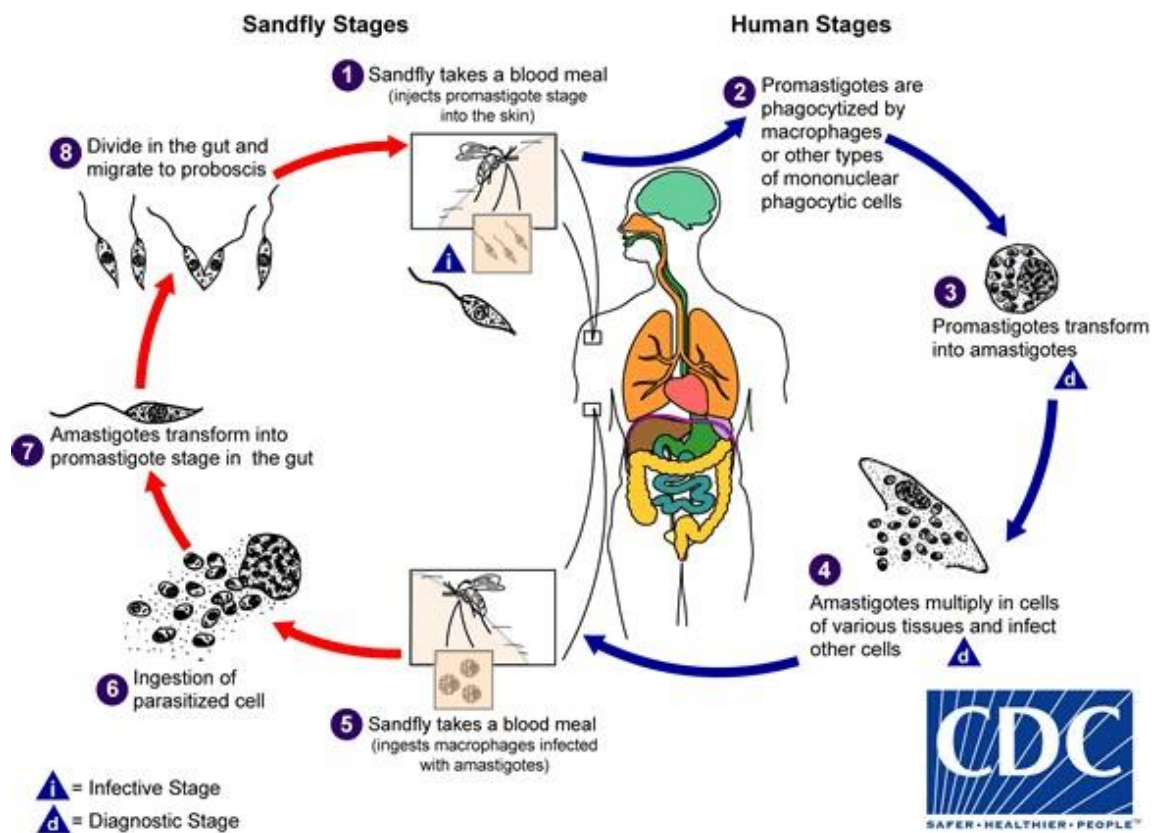
As leishmanioses são doenças causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família *Trypanosomatidae*. O vetor transmissor é um inseto da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub- Família Phlebotominae, pertencente aos gêneros *Phlebotomus* em países do Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas, sendo que apenas as fêmeas possuem hábitos hematófagos e, assim, são capazes de transmitir o parasito aos hospedeiros mamíferos (GRIMALDI & TESH, 1993). O parasito *Leishmania* spp. pode apresentar-se sob duas formas morfológicas: promastigota ou amastigota. As formas promastigotas são formas alongadas, afiladas, com um único flagelo que lhes conferem motilidade, cinetoplasto localizado entre a porção anterior e o núcleo e são encontradas no vetor transmissor. As formas amastigotas são formas arredondadas, com flagelo rudimentar, cinetoplasto em forma de bastão e que se multiplicam nos vacúolos fagocíticos no interior de células do sistema fagocítico-mononuclear dos hospedeiros mamíferos (SACKS & SHER, 2002).

A transmissão do parasito ocorre no momento em que o vetor flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, podendo ingerir, juntamente com a alíquota de sangue, fagócitos infectados por formas amastigotas de *Leishmania* spp. Essas células, ao alcançarem o intestino do vetor, podem se romper e liberar os parasitos, que se transformam rapidamente em formas promastigotas procíclicas e migram para o trato digestório médio e anterior. Os parasitos iniciam um processo de multiplicação e assumem a forma paramastigota, seguida por diferenciação em formas promastigotas metacíclicas e migração para a parte anterior do aparelho bucal do inseto vetor.

Quando um novo repasto sanguíneo ocorrer com o vetor infectado, formas promastigotas metacíclicas, que apresentam elevada motilidade e capacidade migratória, juntamente com a saliva, irão penetrar na derme do hospedeiro mamífero não infectado. Em seguida, as células do sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro, dentre as quais se destacam os macrófagos, podem fagocitar as formas promastigotas do parasito que, no interior dos fagolisossomos formados, podem se diferenciar em formas amastigotas. Os parasitos passam a se multiplicar até que ocorra a lise da célula, quando então há

liberação das formas amastigotas no organismo do hospedeiro. Os parasitos liberados podem ser fagocitados por novas células, dando continuidade à infecção no hospedeiro mamífero, ou podem ser ingeridos por um novo inseto vetor, completando assim o ciclo biológico do parasito (MEDEIROS et al., 2005). O ciclo do parasito é apresentado na figura abaixo:

Figura 1: Ciclo biológico da Leishmania: ciclo de infecção. A figura demonstra o ciclo biológico da leishmaniose visceral, no primeiro momento o mosquito *Lutzomyia* faz o repasto sanguíneo depositando no hospedeiro o parasito na sua forma promastigora (flagelada), em segundo momento os promastigotas são fagocitados por macrófagos e outras células fagocíticas mononucleares, após isso se transformam em amastigotas, se multiplicam e rompem as células infectando novas células. Em repasto sanguíneo o mosquito ingere macrófagos infectados com formas amastigotas e que se transformam em formas promastigotas em seu trato digestivo e o ciclo reinicia.



2.2- Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são doenças infectoparasitárias diretamente relacionada a pobreza e condições de precariedade sanitária, bem como vinculada a fatores climáticos. Essas doenças são endêmicas em 98 países e três territórios distribuídos em regiões tropicais e subtropicais do mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde em 2014 cerca de 90% dos casos de leishmaniose ocorreram no Brasil, Etiópia, Somália, Índia, Bangladesh, Sudão e Sudão do Sul; enquanto 75% da incidência global de LT se encontram no Brasil, Colômbia, Nicarágua, Peru, Afeganistão, Argélia, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (ALVAR et al., 2012, WHO, 2018).

Estima-se que 350 milhões de pessoas encontram-se expostas ao risco de contrair a doença e que haja uma incidência aproximada de 0,2 a 0,4 milhões e de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LV e LT, respectivamente, por ano. No Continente Americano, calcula-se que o Brasil seja responsável por aproximadamente 95% dos casos de LV e 40% dos casos de LT, o que torna a doença um importante problema de Saúde Pública (WHO, 2015; WHO 2018).

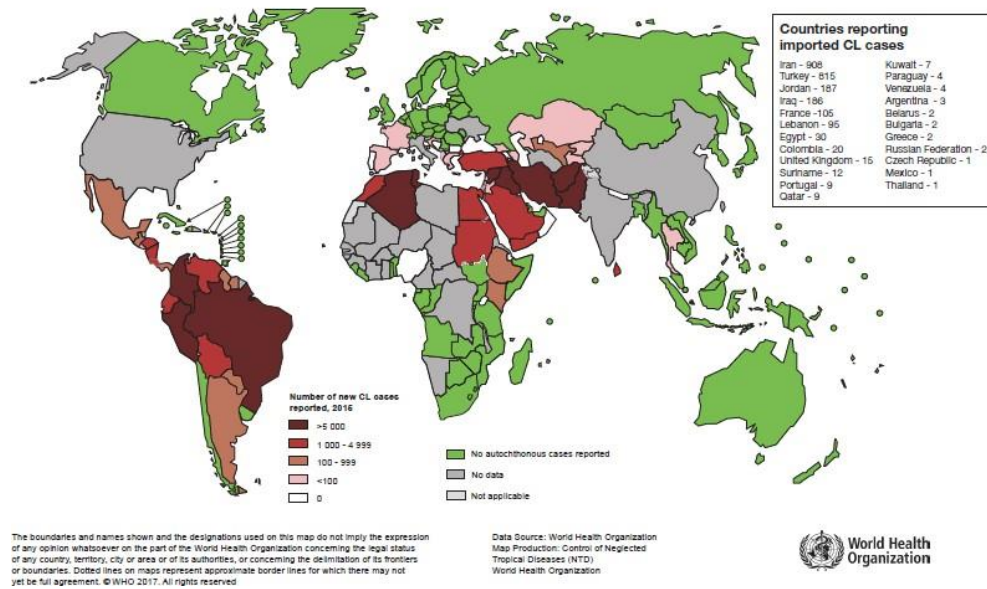
No continente Americano há registro de casos de leishmaniose da Argentina aos Estados Unidos com exceção das Ilhas do Caribe, Chile e Uruguai. Nas Américas a cada ano ocorrem aproximadamente 60.000 casos de leishmaniose tegumentar e 4.000 casos de leishmaniose visceral, com uma taxa de mortalidade de 7%. Além disso, há um aumento na ocorrência de co-infecção HIV-Leishmania. Em relação à leishmaniose visceral, se não tratada à taxa de mortalidade pode chegar a 90% dos casos.

Nas últimas décadas, fatores têm determinado o aumento da incidência de casos de LV na Europa, África, América e Ásia, tais como a migração de pessoas que levam seus cães infectados para áreas onde o vetor se encontra presente, a expansão no *habitat* dos flebotomíneos devido ao aquecimento global, o aumento do número de casos de cães que viajam acompanhando seus donos, esses, residentes em áreas sem a doença, mas que vão visitar local onde o parasito é encontrado; o aumento do desflorestamento devido à urbanização crescente, dentre outros (PALATNIK-DE- SOUZA, 2012). A infecção canina merece também atenção especial, uma vez que apresenta uma maior soroprevalência quando comparada à doença humana e pelo fato de que muitos animais doentes, ainda

que assintomáticos, podem transmitir o parasito a novos hospedeiros mamíferos não infectados, como o homem (OLIVEIRA et al., 2001). Abaixo seguem mapas com distribuição de casos de leishmaniose:

Figura 2: Situação da endemicidade da Leishmaniose Cutânea no mundo em 2015.

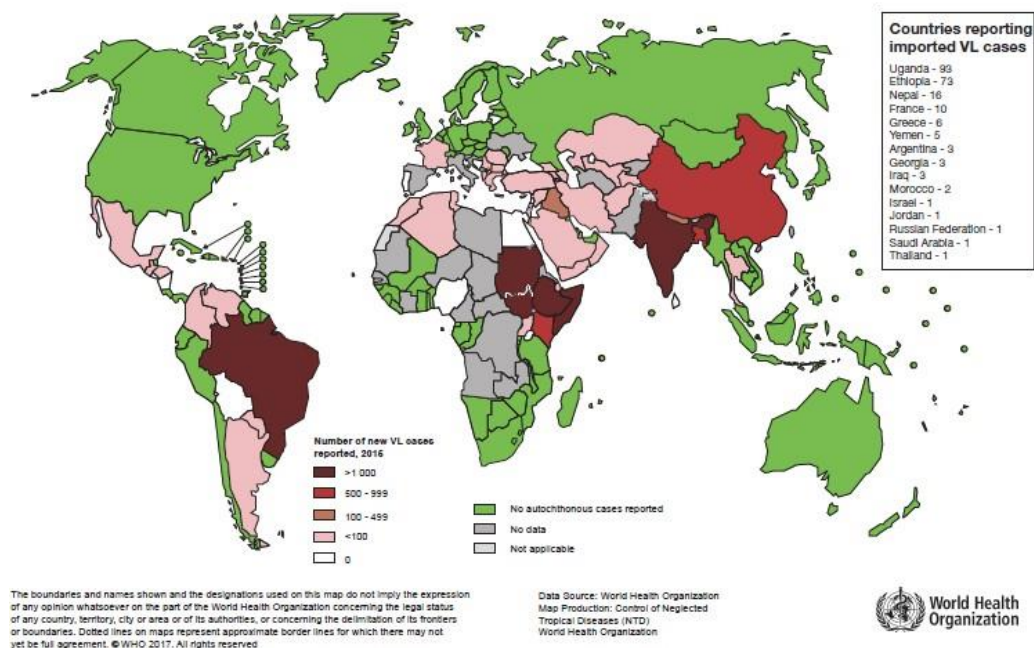
Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2015



Organização Mundial de Saúde, 2018

Figura 3: Situação da endemicidade da Leishmaniose visceral no mundo em 2015.

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2015

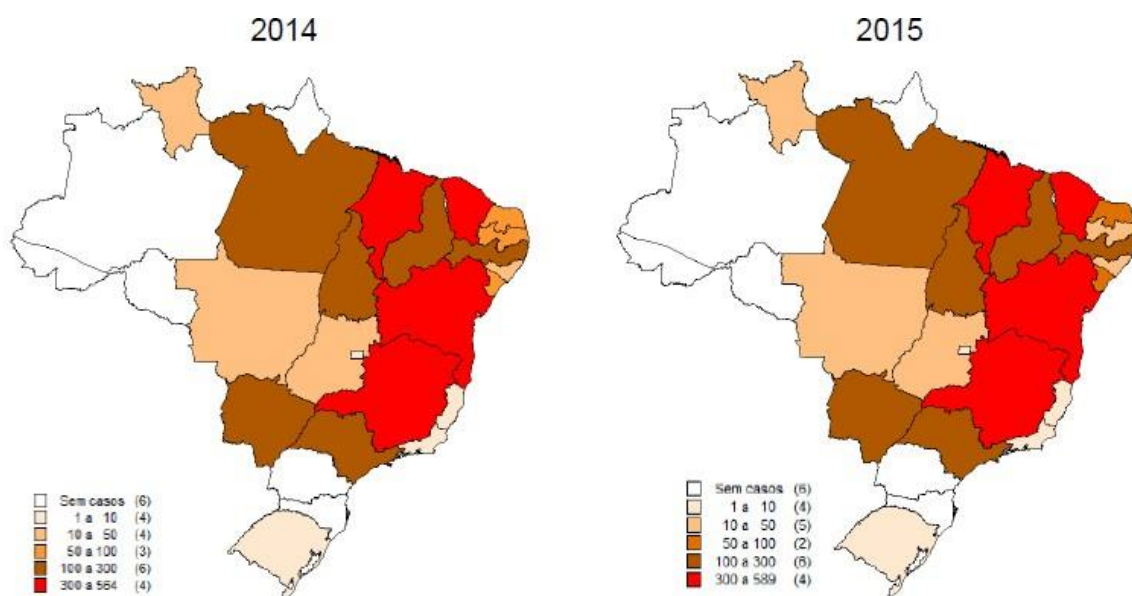


Organização Mundial de Saúde, 2018

Em relação à LV no Brasil, no ano de 2017, ocorreram 4.103 casos, com 327 óbitos. No estado de Minas Gerais ocorreram 750 com 99 óbitos. Esses dados mostram a grande importância dessa doença no Brasil e em Minas Gerais.

Abaixo é mostrado o mapa com a distribuição dos casos de LV por unidade federativa:

Figura 4: Incidência da Leishmaniose visceral por unidade federativa Brasileira nos anos de 2014 e 2015. Os estados mais atingidos pela leishmaniose visceral foram Minas Gerais, Bahia, Maranhão e Ceará.



Organização Mundial de Saúde, 2018

2.3- Manifestações clínicas da LV humana

A patogenia das leishmanioses pode ser determinada pelas interações entre as características genéticas e resposta imune do hospedeiro, pela virulência do parasito infectante e por fatores relacionados ao inseto vetor, como os componentes salivares que portam os parasitos quando da infecção no homem. O resultado desta interação pode levar desde a resistência à infecção, passando pelo desenvolvimento da forma assintomática da doença, até a ocorrência da doença visceral aguda (KANE & MOSSER, 2000).

Na LV no homem, a infecção parasitária acomete principalmente baço, fígado, órgãos linfoides e medula óssea. Após um período de incubação, indivíduos sintomáticos podem apresentar sinais de infecção sistêmica incluindo febre, fadiga, fraqueza, perda de

peso, evidências sugestivas da presença dos parasitos, como hepatoesplenomegalia e inchaço dos gânglios linfáticos (CHAPPUIS et al., 2007). A intensidade das manifestações clínicas é variável e indivíduos podem permanecer assintomáticos por longos períodos de tempo, dificultando seu diagnóstico clínico, embora cerca de 20% dos pacientes infectados desenvolvam a forma aguda da doença (BADARÓ et al., 1986; GAMA et al., 2004).

2.4- Diagnóstico da leishmaniose visceral

O diagnóstico das leishmanioses é realizado com base na avaliação das manifestações clínicas da doença em conjunto com exames laboratoriais. Testes parasitológicos são realizados por meio da punção de aspirados dos linfonodos ou da medula óssea e, embora invasivos, mostram-se conclusivos na identificação dos parasitos através de análises microscópicas em lâminas e/ou culturas *in vitro* dos materiais coletados (REITHINGER et al., 2007).

Testes utilizando métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR *Real Time* também têm sido utilizados para a detecção de ácidos nucleicos específicos do parasito. Entretanto, estas técnicas podem apresentar problemas relacionados com a variação na sensibilidade devido às diferenças referentes às porções do material coletado, que podem não abrigar os parasitos, a necessidade de treinamento técnico especializado, a possibilidade de contaminação com agentes externos podendo gerar resultados falso-positivos, além de apresentarem custo elevado (SUNDAR & RAI, 2002).

Testes sorológicos, tais como ELISA, ensaio de imunofluorescência indireta (IFAT), teste de aglutinação direta (DAT), Western-blot e teste imunocromatográfico (ICT) são utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral e baseiam-se na detecção de anticorpos e/ou antígenos específicos dos parasitos em amostras de soro ou plasma dos indivíduos, entretanto, também podem apresentar problemas de sensibilidade e/ou especificidade de acordo com os antígenos usados (TAVARES et al., 2003).

A detecção sorológica da LV é considerada crítica para um correto diagnóstico laboratorial, para a realização de estudos epidemiológicos e para um controle mais efetivo contra a propagação da doença (MICHALSKY et al., 2007). A técnica de ELISA utilizando extratos proteicos obtidos de formas promastigotas de *Leishmania spp.* não

apresenta sensibilidade satisfatória para a detecção dos casos de LV assintomática (MIRO et al., 2008). A especificidade deste teste também não é satisfatória, uma vez que pode gerar resultados falso-positivos devido à presença de anticorpos nos pacientes com doenças como a doença de Chagas, os quais podem reagir de forma cruzada com antígenos dos parasitos (FERREIRA et al., 2007).

Desta forma, a busca por antígenos que possam conferir uma elevada sensibilidade e especificidade nos casos sintomáticos e assintomáticos é de grande relevância para compor um novo método diagnóstico que possua uma excelente eficácia, além de tais antígenos conseguirem diferenciar pacientes antes e após o tratamento realizado.

2.5- Tratamento da leishmaniose visceral

O tratamento das leishmanioses é realizado com a finalidade de se evitar a mortalidade causada pela LV. Pacientes com a forma visceral da doença devem ser tratados sistemicamente. Recomenda-se ainda que pacientes tratados façam um acompanhamento que pode variar de meses a anos, no intuito de acompanhar a ocorrência de uma possível recidiva da doença (WHO, 2015).

O tratamento é baseado no uso dos antimoniais pentavalentes. O antimoniato de N-metil meglumina, produzido com o nome comercial de Glucantime[®] pela empresa Rhône Poulenc Rorer (França) e o estibogluconato de sódio, produzido com o nome comercial de Pentostan[®] pela Wellcome Foundation (Inglaterra) são os fármacos mais utilizados, entretanto, podem causar diversos efeitos colaterais e tóxicos aos pacientes (BALASEGARAM et al., 2012). Doses diárias elevadas, necessárias ao curso do tratamento, podem causar fadiga, artralgias, mialgias, além de toxicidade renal, hepática, pancreática e cardíaca. A dificuldade no transporte até os centros de saúde especializados para a administração intramuscular ou endovenosa dos medicamentos e o período relativamente longo de tratamento (até 40 dias) acaba por dificultar a adesão dos pacientes ao tratamento, podendo levar à resistência dos parasitos aos produtos utilizados (CARVALHO et al., 2000).

A anfotericina B aparece como uma droga antileishmanial eficiente, entretanto, pode causar febre, cefaleias, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, mal-estar geral, mialgias, artralgias, flebite no local da infusão, anemia hemolítica e nefrotoxicidade

durante a administração. Com o intuito de reduzir seus efeitos colaterais, a anfotericina B lipossomal (AmBisomeTM) foi desenvolvida. A formulação é capaz de reduzir a toxicidade do princípio ativo, entretanto, é um medicamento de custo elevado e necessita ser administrado em ambiente hospitalar. A miltefosina, com o objetivo de tornar o tratamento mais acessível ao paciente, foi o primeiro medicamento que pode ser administrado por via oral utilizado para a LV, entretanto, distúrbios gastrointestinais, nefro e hepatotoxicidade e possível teratogenicidade foram descritos, além de apresentar custo elevado (BALASEGARAM et al., 2012).

Dessa forma, um diagnóstico precoce da doença seria importante para que o paciente seja tratado logo após a patologia ser detectada e consequentemente, há maior efetividade do tratamento, fazendo com que o paciente fique exposto a toxicidade dos medicamentos por menor tempo.

2.6- Medidas de prevenção e controle da leishmaniose visceral

A transmissão das leishmanioses é mantida devido a um sistema biológico e social que envolve o hospedeiro mamífero e o inseto vetor. Normalmente, o controle da disseminação da doença não é eficaz apenas com simples intervenções, fazendo-se necessária uma combinação de gestão estratégica integrada ao controle do vetor e do animal reservatório, de acordo com cada contexto. As medidas de prevenção e controle da doença podem objetivar a interrupção do ciclo biológico do parasito, entretanto, o número elevado de espécies de *Leishmania spp.*, o caráter zoonótico da doença e a manutenção do seu ciclo silvestre dificultam a adoção de medidas eficazes de controle (TESH, 1995).

A estratégia de controle utilizada na LV humana se apoia na detecção dos casos, no diagnóstico correto e no tratamento efetivo dos pacientes, acompanhada de medidas de prevenção à reinfecção, como o uso de repelentes individuais e telas de proteção nas casas. Tais medidas podem reduzir a transmissão da doença, mas não geram um impacto significativo (GRIMALDI & TESH, 1993). No que se refere à LVC, o cão, como um importante reservatório doméstico dos parasitos, representa uma importante fonte de infecção para o vetor transmissor, agindo como um elo na manutenção da transmissão entre o vetor e o homem. Para o controle dos cães, órgãos de Saúde Pública devem

realizar a triagem dos animais através da detecção de sinais clínicos e de testes sorológicos, sendo que tanto os animais sintomáticos, quanto os assintomáticos, devam ser eutanasiados com a finalidade de se tentar reduzir a disseminação do parasito.

Esta medida de controle tem apresentado falhas devido a determinados donos recusarem a realização do teste em seus animais de estimação, ou ainda, devido a não autorização do processo de eutanásia em animais doentes. Junto a estas falhas, há o problema de rápida reposição de animais em áreas endêmicas ou a escolha de se tratar os animais, o que, na maioria dos casos, mostra-se ineficiente para a redução do número de casos naquele ambiente (GONTIJO & MELO, 2004). A utilização de inseticidas tópicos ou impregnados em coleiras e a vacinação poderiam ser estratégias preventivas com algum impacto no controle da LVC (WERNECK, 2014). Em relação aos hospedeiros selvagens, a eliminação não é uma medida executável ou ecologicamente correta. Além disso, existe a possibilidade de adaptação do parasito a outros reservatórios existentes em ambientes rurais (GRAMICCIA & GRADONI, 2005).

Devido às dificuldades encontradas na execução dos métodos profiláticos, a problemas de sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos e aos relacionados aos tratamentos, o desenvolvimento de novas medidas profiláticas, tais como a busca por vacinas, torna-se uma alternativa atrativa e vem sendo muito pesquisada por diferentes grupos; entretanto, essa é uma tarefa complexa, embora seja considerada uma solução real e com melhor custo-benefício para o controle efetivo e prevenção da doença (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2012). Porém o uso das tecnologias de protômica como a apresentação de fagos tem sido importante na busca de proteínas e peptídeos que possam ser úteis no desenvolvimento de novos testes diagnósticos e vacinas (COELHO, et. al. 2015).

2.7- Resposta imune na leishmaniose visceral humana

A melhora da LV está relacionada ao desenvolvimento de uma resposta celular mediada por linfócitos T. Mais especificamente, a resposta celular mediada por linfócitos Th1 é associada com a ativação de macrófagos, a resistência do hospedeiro infectado e com a proteção contra *Leishmania*; podendo levar ao controle da doença. Por outro lado, a resposta mediada por linfócitos Th2 está associada com a regulação negativa da ativação de macrófagos e, eventualmente, com a progressão da doença.

Infelizmente, a distinção entre a ativação de células Th1 e Th2 é um modelo simplificado, de forma que muitos pacientes demonstram um perfil de resposta inespecífica e/ou mista. As citocinas mais estudadas na resposta celular na LV são o IFN- γ , TNF- α e IL-10. Verificou-se que os níveis de IL-10 estavam aumentados em pacientes da Índia com LV ativa e naqueles com propensão para desenvolver leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) (GASIM et al., 1998). O aumento na concentração de IL-10 em pacientes com LV foi posteriormente confirmado em pacientes de outros países, como Brasil e Etiópia (ANSARI et al., 2006; COSTA et al., 2012). Níveis menores de IL-10 foram encontrados após o tratamento da doença (CILLARI et al., 1995; DUTHIE et al., 2014) e em indivíduos controles (ANSARI et al., 2006). Também, tal citocina foi correlacionada positivamente com a carga parasitária no sangue de pacientes com LV (VERMA et al., 2010) e no tecido lesional de pacientes com PKDL (KATARA et al., 2011).

O TNF- α é uma citocina produzida, principalmente, por macrófagos ativadas. A participação dessa molécula na LV é contraditória, uma vez que estudos correlacionam seus níveis elevados com a LV ativa (GAMA et al., 2004; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006), seguida pela diminuição após o tratamento; enquanto outros mostram a presença de baixos níveis dessa citocina em pacientes com LV aguda (KARKJIAN et al., 2006). IFN- γ é uma citocina envolvida na resposta imune inata e adquirida, importante na ativação de macrófagos e no combate contra infecções intracelulares. De maneira similar ao TNF- α , IFN- γ foi mostrado em alguns estudos estar em níveis elevados em pacientes com LV ativa na Índia (ANSARI et al., 2006), Bangladesh (DUTHIE et al., 2014) e Irã (KHOSHDEL et al., 2009). Também, resultados encontrados em pacientes com LV assintomática mostraram que 48% dos pacientes apresentavam níveis elevados dessa citocina (GAMA et al., 2004). Em um estudo recente em crianças com LV, observou-se que níveis baixos de IFN- γ foram correlacionados com a ocorrência de sintomas como icterícia e hemorragia (GAMA et al., 2013). Em relação à co-infecção entre HIV e LV, os níveis de TNF- α e IFN- γ estavam significativamente mais elevados nos soros de pacientes com HIV que posteriormente desenvolviam LV, enquanto que os níveis de IL-10 permaneciam baixos em tais indivíduos. Tais correlações foram também encontradas em pacientes com LV co-infectados com dengue, doença de Chagas e malária (VAN DER BOGAART et al., 2014).

Citocinas como IL-6 (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006) e IL-12

(DUTHIE et al., 2014) revelaram-se significativamente aumentadas nos soros de pacientes com LV. Em doentes com LV sudaneses e etíopes, os níveis de tais citocinas voltaram para concentrações normais após o tratamento, estando ausentes em pacientes curados ou naqueles assintomáticos (COSTA et al., 2012). Entretanto, em estudos desenvolvidos em Bangladesh e no Brasil, IL-12 mostrou-se elevada em pacientes com LV assintomática (GAMA et al., 2004).

Conforme mencionado anteriormente, a maioria das pessoas infectadas com *L. donovani* não desenvolve a doença clínica, permanecendo assintomáticas (Nylén & Kumar, 2012). Os fatores que influenciam a susceptibilidade à LV não são bem entendidos. Recentemente, as citocinas IL-17 e IL-22 foram usadas para identificar pacientes resistentes à doença aguda no Sudão (HUGHES & KELLY, 2006; PITTA et al., 2009).

Ao contrário da LV em modelo murino, no qual há um curso definido da infecção em órgãos específicos dos animais, a doença humana se manifesta sob uma forma mais heterogênea, com níveis diferentes de infecção crônica observados no baço, fígado e medula óssea dos pacientes. A maioria das infecções por *Leishmania* no homem são subclínicas ou assintomáticas, sendo tal fato atribuído ao desenvolvimento de resposta imune mediada por células, específicas aos parasitos (OSTYIA et al., 2011). Apenas uma pequena proporção de indivíduos infectados desenvolve a doença aguda, sendo que pacientes com LV que se recuperam da infecção são geralmente resistentes à reinfeção (JERONIMO et al., 2000). A imunidade mediada por células supressoras é observada na doença aguda, nos quais PBMC de pacientes são pouco ativos (SINGH et al., 2012).

Em contraste, quando tais células são extraídas de pacientes curados e estimuladas, as mesmas são capazes de proliferar e produzir citocinas como TNF- α IFN- γ . Estudos também mostram que IL-10 é produzida em maior quantidade por células de sangue total de pacientes com LV aguda, em resposta à estimulação com antígenos parasitários. As propriedades da IL-10 na desativação de macrófagos e células dendríticas afetam a ativação de células T e a produção de citocinas durante a infecção crônica, promovendo a persistência dos parasitos (COUPER et al., 2008). Já o aumento dos níveis de TNF- α IFN- γ foi associado com a redução do crescimento parasitário (GAUTAM et al., 2011), indicando que a IL-10 é uma supressora dos mecanismos imunitários leishmanicidas em pacientes com LV.

A LV está também associada com a produção de níveis elevados de anticorpos anti- *Leishmania*. Embora às vezes útil no diagnóstico, o papel dos anticorpos na patogênese da LV não é claro. O nível elevado de anticorpos pode conduzir à formação de complexos imunes, levando à produção de IL-10 por macrófagos, contribuindo para a patogênese da doença (BUXBAUM & SCOTT, 2005).

Exames sorológicos de primeira linha são baseados na detecção de anticorpos no soro dos pacientes (SRIVIDYA et al., 2012). Dois testes são usados atualmente para o diagnóstico da LV: o teste de aglutinação direta (DAT), com base no uso do extrato total de *L. donovani* e a proteína recombinante K39 (rK39), em kits contendo fitas imunocromatográficas. Outros antígenos são pesquisados para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sob a forma de proteínas recombinantes, tais como: rK9, rK26, rK28, triparedoxina peroxidase, rGP63, rLepp12, rORFF, BHUP2, RKLO8, rHSP70, proteína de ligação ao guanilato (GBP), peroxidoxina recombinante, amastina, dentre outros (PATTABHI et al., 2010; SOUZA et al., 2013).

Entretanto, anticorpos possuem meia-vida longa e permanecem em níveis detectáveis por até vários anos após o tratamento (VALLUR et al., 2013), o que compromete o diagnóstico em casos de recidiva e em nova aplicação de fármacos (BANDYOPADHYAY et al., 2004). Embora não muito sensível, a imunoglobulina E (IgE) específica de *Leishmania* foi sugerida ser um marcador da LV ativa, estando em níveis indetectáveis nos soros de pacientes assintomáticos, com doença de Chagas ou em controles saudáveis. Além disso, concentrações aumentadas de IgE anti-*Leishmania* voltaram aos valores normais após o tratamento (SAHA et al., 2005), embora nenhuma alteração dos níveis dessa imunoglobulina tenha sido observada em pacientes com LV ou em controles saudáveis..

Além da desvantagem da meia-vida dos anticorpos antileishmaniais nos soros dos pacientes, testes sorológicos tendem a ser positivos quando aplicados em indivíduos não infectados ou em pacientes assintomáticos, em ambos os casos, residentes em áreas endêmicas de LV (ROMERO et al., 2009). Devido a essas limitações para o monitoramento do tratamento, tais marcadores têm sido excluídos ou pouco utilizados na prática clínica.

Poucos estudos têm avaliado e comparado pacientes com LV ativa, com aqueles desenvolvendo a doença subclínica ou assintomática e indivíduos controles, embora esta

estratégia possa ser considerada interessante na abordagem do paradigma Th1/Th2. Quando um biomarcador é avaliado pela sua capacidade de monitorar o efeito do tratamento, quase sempre o mesmo é avaliado nas condições pré e pós-tratamento, sem repetições longitudinais. Assim sendo, torna-se uma missão difícil a avaliação do potencial farmacodinâmico da maioria dos biomarcadores estudados.

Também, trabalhos usualmente não focam na correlação dos níveis de biomarcadores com as características clínicas dos pacientes, enquanto tal correlação é normalmente abordada na LT (como, por exemplo, relacionando o maior ou menor tamanho da lesão com níveis aumentados ou diminuídos dos biomarcadores). Também, o tempo necessário para os biomarcadores regressarem à normalidade (caracterizada pela sua meia-vida de eliminação) é quase sempre elevado. A maioria dos marcadores relacionados com anticorpos tem uma meia-vida de eliminação muito longa, de até vários anos, permanecendo no corpo por muito tempo após a resolução da doença, o que compromete a diferenciação de pacientes com a doença ativa daqueles já tratados e curados. Por fim, fatores como a viabilidade prática, custos e coleta menos invasiva das amostras devem ser também levados em conta (KIP et al., 2015).

2.8- Proteínas utilizadas no projeto

As proteínas LiHyT (XP_001465138.1), LiHyp6 (XP_001568689.1), HRF (CAJ05086.1),

LiHyV (XP_888524.1) e LiHyD (LinJ.33.3150), utilizadas neste trabalho, foram identificadas por anticorpos em soros de cães com LV sintomática e/ou assintomática (COELHO et al., 2012). As proteínas foram identificadas nos genomas de *L. infantum*, *L. brasiliensis* e *L. major*, entretanto, genes ortólogos de *L. infantum* foram identificados para LiHyp6 (LinJ.36.0580), HRF (LinJ.24.1560) e LiHyV (LinJ.04.0160). Tais antígenos foram recentemente testados como candidatos ao sorodiagnóstico e/ou como vacinas na LV murina e canina, e mostraram elevado grau de sucesso (MARTINS et al., 2013; Martins et al., 2015^a; MARTINS et al., 2015b; COELHO et al., 2016 e LAGE et al., 2016).

A proteína LiHyp6 possui uma sequência de 210 aminoácidos, os quais conferem um peso molecular de aproximadamente 23,8 kDa. Sabe-se ainda que esta proteína encontra-se presente nas formas promastigotas dos parasitos e foi reconhecida por soros de cães com LV sintomática.

A proteína HRF (*IgE-dependent histamine-releasing factor*) possui uma sequência de 170 aminoácidos e peso molecular de 19,4 kDa. É conservada dentre alguns eucariotos e está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo estabilização de estrutura celular, ligação de cálcio, apoptose, inibição e prevenção de estresse e morte celular, além de estar presente em células durante o estágio inicial de crescimento de alguns tumores.

A LiHyV é uma proteína que possui uma sequência de 528 aminoácidos, os quais conferem à mesma um peso molecular de aproximadamente 53,7 kDa. É uma proteína de superfície que está presente principalmente no estágio amastigota dos parasitos e foi reconhecida por anticorpos presentes nos soros de cães com LV sintomática e assintomática.

A proteína LiHyD foi reconhecida por anticorpos presentes em soros de cães com LV. A proteína possui uma sequência de 327 aminoácidos, os quais conferem à mesma um peso molecular de aproximadamente 36,7 kDa. Trata-se de uma proteína específica de *Leishmania* e que é conservada em diferentes espécies do parasito, incluindo espécies causadoras de LT. A partir de análises de bioinformática, confirmou-se a presença de epitopos específicos para linfócitos B e T na proteína e, portanto, a mesma foi selecionada como candidata a antígeno marcador para o diagnóstico da LV e como candidata a compor uma vacina que ofereça proteção cruzada contra as leishmanioses.

Dessa forma, tais moléculas foram também testadas em pacientes com LV, no sentido de avaliarmos sua reatividade humoral, além dos níveis de anticorpos específicos existentes antes e após o tratamento, no sentido de buscarmos novos biomarcadores de progressão ou resolução da LV.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

⇒ Avaliar o perfil da resposta imune celular e humoral em pacientes com leishmaniose visceral (LV) antes e após o tratamento, utilizando as proteínas LiHyT, LiHyp6, HRF, LiHyV e LiHyD em sua forma recombinante, com vistas a se buscar novos biomarcadores, associados com o diagnóstico e a progressão da doença.

3.2- Objetivos específicos

- Avaliar a reatividade sorológica das proteínas recombinantes LiHyT, LiHyp6, HRF, LiHyV e LiHyD para o sorodiagnóstico da LV.
- Avaliar a reatividade dos subtipos IgG1 e IgG 2, frente às proteínas recombinantes LiHyT, LiHyp6, HRF, LiHyV e LiHyD.
- Avaliar a resposta humoral específica às proteínas recombinantes LiHyT, LiHyp6, HRF, LiHyV e LiHyD em soros de pacientes com LV antes e após o tratamento, comparando com resultados obtidos usando o extrato proteico solúvel dos parasitos.
- Avaliar a resposta celular específica às proteínas recombinantes LiHyT, LiHyp6, HRF, LiHyV e LiHyD, por meio da produção de citocinas IFN- γ e IL-10 por ELISA de captura em PBMC de pacientes com LV antes e após o tratamento, a fim de avaliar o perfil imunológico em ambos os casos

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Aspectos éticos

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE–323431.14.9.0000.5149) e da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (CAAE–60802116.1.0000.5138) (anexo I). Os pacientes e/ou seus representantes legais foram esclarecidos quanto à natureza e aos objetivos do trabalho, antes de assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice II). Os sujeitos da pesquisa estiveram livres de qualquer risco, prejuízo ou dano potencial à sua saúde. Como critérios de inclusão, pacientes de todas as faixas etárias com diagnóstico clínico e parasitológico de LV e que tenham assinados por livre vontade o TCLE, ou que seu representante legal o tenha feito, foram incluídos no trabalho. Como critérios de exclusão, pacientes ou seus representantes legais que se recusaram a continuar na pesquisa não tiveram suas amostras de sangue utilizadas.

4.2- Amostras de sangue

Os pacientes com LV foram selecionados de uma área endêmica da doença (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e durante a sua internação na Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (n=30, incluindo 17 homens e 13 mulheres, com idade entre 22 a 58 anos). O grupo controle consistiu de indivíduos saudáveis residentes em área endêmica de LV (Belo Horizonte) sendo que gênero e idade foram pareados (n=30, incluindo 19 homens e 11 mulheres, com idade entre de 19 a 49 anos) e área não endêmica (n=15, incluindo 9 homens e 6 mulheres, com idade entre 23 a 56 anos, Poços de Caldas, MG, Brasil). Tais indivíduos não apresentavam sinais clínicos ou suspeita de leishmaniose além de apresentarem resultados negativos para LV ao serem submetidos a testes com a presença de rK39, caracterizando assim a inexistência de anticorpos específicos para Kalazar D t t™ T t (InB o Int n t on l, USA). Visando a avaliação da reação cruzada dos antígenos, amostras de soro de pacientes com doença de Chagas, paracoccidioidomicose, hanseníase e aspergilose foram também coletadas. Em relação ao grupo com doença de Chagas (n=30, incluindo 22 homens e 8 mulheres, com idade entre 25 e 62 anos), a infecção foi confirmada por hemocultura e por Chagatest recombinante ELISA v. 3.0 e Chagatest hemagglutination inhibition (HAI) (Wiener Lab., Argentina). O diagnóstico dos pacientes

com paracoccidioidomicose (n=4, 2 homens e 2 mulheres com idade entre 23 e 49 anos) foi confirmado por PCR. O diagnóstico dos pacientes com hanseníase (n=20, com 12 homens e 8 mulheres, com idade entre 20 e 49 anos) foi feito por avaliação clínica, ML Flow teste rápido e histopatologia de lesões de pele. Por fim, pacientes com aspergilose (n=8, incluindo 5 homens e 3 mulheres, com idade entre 28 e 63 anos) foram diagnosticados por exame clínico, histopatológico e PCR.

4.3- Cálculo amostral

Cálculos amostrais foram realizados para se determinar o número de pacientes em cada grupo experimental. Portanto para a análise sorológica o cálculo foi feito considerando a resposta frente ao extrato solúvel de *Leishmania* (SLA) utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon com efeito de 0,72, e poder de 0,95, enquanto para a análise de citocinas após estímulo de PBMC foi escolhida a citocina IL-10 onde foi feito um teste de Wilcoxon, pareado com efeito de 0,32 e poder de 0,95.

4.4- Coleta de sangue para separação de PBMC

Para avaliação da atividade dos PBMCs frente aos antígenos antes e 6 meses após o tratamento medicamentoso, foram incluídos no estudo 11 pacientes, sendo que 5 pacientes não permaneceram no estudo por (1 óbito e 3 casos de co-morbidades que poderiam interferir na análise). Amostras de sangue de 11 pacientes com LV aguda foram coletadas (20 mL de cada indivíduo coletados em heparina sódica). A infecção foi confirmada pela técnica de PCR dirigida ao kDNA de *L. infantum* em amostras de sangue total do paciente (5 mL coletados em EDTA). Nenhum dos pacientes recebeu tratamento antes da coleta das amostras. As amostras foram processadas no mesmo dia da coleta. Ainda, 6 meses após o tratamento a coleta de 20mL de sangue (em tubo com heparina sódica) foi realizada nos 7 pacientes que continuaram no estudo.

4.5- Diagnóstico da doença

O diagnóstico dos pacientes foi baseado nas manifestações clínicas da doença e por meio de exame parasitológico molecular (PCR), conforme as etapas descritas abaixo:

4.5.1- Extração de DNA

Amostras de sangue periférico, foram submetidas à extração de DNA total com o kit

-QIA mp DNA m n K tl (QIAGEN GmbH, H l n, Al m nh), o o om p f ã do fabricante. Foram realizados controles negativos da extração.

4.5.2- Reação de PCR

O DNA extraído das amostras clínicas será submetido à reação de PCR, utilizando iniciadores desenhados para amplificação de regiões do genoma que são marcadores moleculares para cada espécie em estudo. Controles negativos e positivos da PCR serão incluídos em todas as etapas da reação. O controle positivo será sempre o DNA extraído de amostras Padrão, servindo como referencia para todas as reações. Como controle negativo da reação, serão usadas misturas que contêm todos os componentes da reação, contendo água ultrapura estéril no lugar do DNA extraído. O produto final da amplificação será analisado em gel de poliacrilamida 6%, corado por nitrato de prata.

4.6- Preparo do extrato proteico solúvel de *Leishmania*

A espécie *L. infantum* (MHOM/BR/1974/BH46) foi utilizada. Os parasitos foram cultivados a 24°C em meio de cultura S hn ' (Sigma-Aldrich, USA) completo, que foi constituído pelo meio de S hn ' o om 10% o o f t l bov no n t v o (Sigma), 20 mm de L- glutamina, 200 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, pH 7,4. O extrato proteico solúvel dos parasitos (SLA) foi preparado conforme descrito em Coelho et al. (2003).

4.7- Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes

Formas promastigotas em fase estacionária de *L. infantum* foram utilizadas para a extração do DNA dos parasitos e utilização nas reações de PCR como DNA molde. Para tal, a extração do DNA foi realizada utilizando 2×10^8 p to o k t -*Genomic DNA from tissue* (M herey- Nagel, Duren, Germany) foi usado de acordo com as recomendações do fabricante. Os *primers* para a clonagem das proteínas LiHyT, LiHyp6,

HRF, LiHyV e LiHyD foram desenhados de acordo com as referências citadas, bem como os protocolos de clonagem, expressão e purificação das proteínas foram realizados conforme descrição abaixo:

4.7.1- Proteína recombinante LiHyT

Contem, 318 resíduos linearizados, totalizando em uma massa molecular de aproximadamente 36,6 kiloDaltons (kDa). É uma proteína que não apresenta peptídeo sinal e que se encontra expressa na forma amastigota dos parasitos, sendo reconhecida por anticorpos presentes no soro de cães com LV assintomática e sintomática. Clonagem e expressão: As sequencias de nucleídeos e aminoídeos LiHyT (LinJ.200050) foram obtidas de TriTrypDB (<http://trit-rypdb.org>).

Para obtenção da proteína recombinante, a região de codificação foi amplificado por PCR, utilizando DNA genômico de *L. infantum* (Genes de *Leishmania* carecem de introns) e foram utilizados os seguintes primers: Frente (5'GGATCCATGCAGATGCAAGGCAACATG-3') e reverso (5'-AAGCTTATTGTTGCCGCATACTTGG-3'). A região codificada foi clonada no pGEM[®]-T Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) e a dupla fita foi sequenciada. Depois a inserção de DNA foi obtida por um BamHI e HindIII dupla digestão avanço de alimentação dos sítios de corte correspondentes incluídos nos iniciadores [underlined]) e transferidos para os mesmos locais de exclusão do plasmídeo pQE30 (Qiagen, Hilden, Alemanha). Plasmídeo recombinante foi transformado em *Escherichia coli* M15, onde a superexpressão da recombinação. A proteína Nantin foi realizada pela adição de 10 mM de IPTG (isopropil-b-D- thiogalactopyranoside, Promega, Montreal, Canadá) por 3 ha 37 ° C. Para purificação de proteínas, células foram lisadas por um homogeneizador após cinco passagens através do aparelho. O produto foi centrifugado em 13.000 x g por 20 min a 4 ° C. A proteína purificada foi passada em uma coluna de polimixina-agarose (Sigma-Aldrich) para remover o conteúdo residual de endotoxina (<10 ng de lipopolissacarídeo por 1 mg de proteína, medido pelo Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Assay QCL-1000; BioWhittaker, Walkersville, EUA) (MARTINS , et. al., 2016).

4.7.2- Proteínas recombinantes HRF e LiHyP6

A proteína recombinante HRF contém 170 aminoácidos e peso molecular de 19,4 kDa. É conservada dentre alguns eucariotos e está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo estabilização de estrutura celular, ligação de cálcio, apoptose, inibição e prevenção de estresse e morte celular, além de estar presente em células durante o estágio inicial de crescimento de alguns tumores.

A proteína LiHyp6 possui uma sequência de 210 aminoácidos, os quais conferem um peso molecular de aproximadamente 23,8 kDa. Sabe-se ainda que esta proteína encontra-se presente nas formas promastigotas dos parasitos e foi reconhecida por soros de cães com LV sintomática.

Clonagem e Expressão: Identificada por anticorpo de cães com LV sintomática e assintomática. Identificadas nos genomas de *L. infantum*, *L. brasiliensis* e *L. major*. Genes ortólogos de *L. infantum* foram identificados para LiHyp6 (LinJ.36.0580), HRF (LinJ.24.1560) e LiHyV (LinJ.04.0160). Os primers utilizados para amplificar os genes para LiHyp6 e HRF do DNA de *L. infantum* genômico foram:

5' TTTGCTAGCATGAGCTTCTTTGACTTCTCA-3' (*forward*) e
 5' TTTAAGCTTTCATTGCAGAACTTTGAGTACA-3' (*reverse*) para proteína LiHyp6,
 e 5'- GGATCCATGAAGATCTTCAAGGATGTG-3' (*forward*) e 5'-

AAGCTTAGACGCGCTCGCCCTTCAG-3' (*reverse*) para a proteína HRF. Locais de corte para BamHI e HindIII (underlined) foram incluídos para fins de clonagem em ambos os casos. Para PCR, foi utilizado DNA genômico de *L. infantum*. Após amplificação, os fragmentos de ADN foram excisados dos géis, purificados e ligados a sistemas vectoriais pGEM-T easy (Promega, USA). Plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue (Phoneutria, Brasil). Os clones positivos foram testados por análise de restrição com EcoRI, e os que apresentaram genes para LiHyp6 ou HRF foram propagados, seqüenciados em cadeia dupla e usados na construção do vetor de expressão. Os fragmentos de DNA obtidos a partir da digestão de NheI / EcoRI e BamHI / HindIII dos plasmídeos pGEM- LiHyp6 ou pGEM-HRF foram ligados nos locais de corte correspondentes dos plasmídeos pET- 28a-c e pQE30, respectivamente (Qiagen, Hilden, Alemanha) e transformados em BL21AI e Cepas M15 de *E. coli* para superexpressão induzidas pela adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo 1 mM (IPTG) (Promega, Montreal, Canadá). Após indução, as células foram rompidas por cinco ciclos de ultra-

sons (15 seg cada, 90 MHz) num tampão de ligação (tampão fosfato 0,02 M, pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazole 0,005 M, ureia 8 M e 0,001 M de p-mercaptoetanol). A presença das proteas recombinantes nos extractos de sobrenadante ap centrifugao (13.000 x g, 20 min a 4) foi analisada por SDS-PAGE unidimensional. Ambas as proteínas mostraram-se solúveis e foram purificadas sob condições nativas, seguindo as instruções do fabricante (Qiagen). Resumidamente, as proteínas rLiHyp6 e rHFR foram transferidas por fluxo gravitacional para colunas de agarose- acido nitrilotriaceico (Ni-NTA). As proteínas recombinantes foram lavadas sucessivamente (1 coluna vol.) Em tampão de ligação e em tampão de lavagem (tampão fosfato 0,02 M, pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazole 0,005 M e 0-mercaptoetanol 0,001 M) e eluídas em tampão de eluição (0,02 M tampão fosfato pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 0,5 M, e p-mercaptoetanol 0,001 M). Após eluição, as proteínas foram dialisadas contra 1x tampão fosfato salino (PBS). As proteínas rLiHyp6 e rHRF foram concentradas em concentrado de vácuo Vacufuge eppendorf e posteriormente purificadas em uma coluna de filtração em gel Superdex™ 200 (GE Healthcare Life Sciences, EUA). Após purificação, as proteínas recombinantes foram passadas através de uma coluna de polimixina- agarose (Sigma) para remover qualquer conteúdo residual de endotoxinas. A pureza das proteínas recombinantes foi verificada por um SDS-PAGE unidimensional (MARTINS, et. al., 2015a).

4.7.3- Proteína recombinante LiHyV

Possui 528 aminoácidos, os quais conferem à mesma um peso molecular de aproximadamente 53,7 kDa. É uma proteína de superfície que está presente principalmente no estágio amastigota dos parasitos e foi reconhecida por anticorpos presentes nos soros de cães com LV sintomática e assintomática. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos da proteína recombinante LiHyV (XP_888524.1) foram obtidas do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento local da sequência protéica contra os genomas completos disponíveis de outros organismos foi realizado pelo BLAST, que verificou uma alta homologia da sequência de aminoácidos (> 85%) desta proteína entre as espécies *L. major*, *L. amazonensis* e *L. infantum* espécies. A proteína recombinante foi obtida após clonagem de um fragmento de DNA de

L. infantum (MHOM / BR / 1970 / BH46) contendo a região codificante da proteína. Inicialmente, o DNA genômico foi extraído usando uma extração de fenol: clorofórmio, e isso foi usado como molde. Os primers (5'-GACGGATCCATGTTCGGACGCATCATTC-3) e (5'-GCACAAGCTTAAGGGCGTAGAAAGCGGC-3) foram desenhados de acordo com a sequência de DNA do ORF descrito no banco de dados de sequências do genoma de *L. infantum* (LinJ. 04.0160). O produto de PCR foi clonado no vector pGEM-T easy confirmado por sequenciação e transferido para o vector de expressão pET21a (Novagen), utilizando as enzimas de restrição BamHI e HindIII incluídas nos iniciadores para este fim (underlined). O plasmídeo recombinante foi transformado em *Escherichia coli* BL21 (DE3). A expressão da proteína recombinante foi realizada adicionando 1,0 mM de IPTG (isopropil - β - D-tiogalactopirano, Promega, Montreal, Canada), durante 3 h a 37°C, quando as células foram lisadas por um homogeneizador após cinco passagens através do aparelho. O produto foi centrifugado a 13.000 \times g por 20 min a 4 ° C, enquanto a proteína rLiHyV, contendo uma marca de 6x resíduos de histidina, foi purificada sob condições não desnaturantes, utilizando uma coluna de 5 mL HIS-Trap (GE Healthcare Life Science) anexada a um sistema FPLC (GE Healthcare Life Science). Após a purificação, o conteúdo de proteína recombinante foi passado através de uma coluna de polimixina-agarose (Sigma), a fim de remover as endotoxinas residuais (MARTINS, et. al., 2015b).

4.7.4- Proteína recombinante LiHyD

Possui uma sequência de 327 aminoácidos, os quais conferem à mesma um peso molecular de aproximadamente 36,7 kDa. Trata-se de uma proteína específica de *Leishmania* e que é conservada em diferentes espécies do parasito, incluindo espécies causadoras de LT. A partir de análises de bioinformática, confirmou-se a presença de epítopos específicos para linfócitos B e T na proteína e, portanto, a mesma foi selecionada como candidata a antígeno marcador para o diagnóstico da LV e como candidata a compor uma vacina que ofereça proteção cruzada contra as

leishmanioses. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos da LiHyD (LinJ.333150) foram obtidas pela Tri-TrypDB (<http://tritrypdb.org>). O alinhamento local da sequência de HiDyD contra os genomas completos disponíveis de outros organismos foi realizado pelo BLAST. Para obter a proteína recombinante (rLiHyD), a região de codificação foi amplificada por PCR, utilizando DNA genômico de *L. infantum* (Genes de *Leishmania* carecem de introns) e foram utilizados os seguintes primers: F nt (5'GGATCCATGCAGATGCAAGGCAACATG-3') e R nt (5'-AAGCTTATTGTTGCCGCACTTGG-3'). A reação foi realizada no pGEM[®]-T Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) e a dupla fita foi sequenciada. Depois a inserção de DNA foi obtida por um BamHI e HindIII dupla digestão avanço de alimentação dos sítios de corte correspondentes incluídos nos iniciadores [underlined] e transferidos para os mesmos locais de exclusão do plasmídeo pQE30 (Qiagen, Hilden, Alemanha). O plasmídeo recombinante foi transformado em *Escherichia coli* M15, onde a superexpressão da recombinação. A proteína Nantin foi realizada pela adição de 10 mM de IPTG (isopropil-b-D-thiogalactopyranoside, Promega, Montreal, Canadá) por 3 ha 37 ° C. Para purificação de proteínas, células foram lisadas por um homogeneizador após cinco passagens através do aparelho. O produto foi centrifugado em 13.000 x g por 20 min a 4 ° C. A proteína rLiHyD, contendo 6 x resíduos de histidina fundidos à sua região N-terminal, foi purificada sob condições não desnaturantes usando uma coluna de 5 mL His-Trap (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, EUA) acoplada a um FPLC (GE Healthcare Life Science). A proteína recombinante foi dialisada usando solução salina como um buffer. Após diálise, o rLiHyD foi passado através de uma coluna de polimixina - agarose (Sigma), por remover o conteúdo residual de endotoxina (<10 ng de LPS por 1 mg de proteína recombinante como medido pelo Ensaio Chromogénico Quantitativo de *Limulus* QCL-1000; BioWhittaker, Walkersville, EUA) (LAGE, et. al., 2015).

A proteína rA2 foi usada como antígeno diagnóstico controle (Zhang, W.W. *et al.*, 1996) Após a purificação, as proteínas recombinantes foram passadas em uma coluna de polimixina- agarose (Sigma, USA), para a remoção de endotoxinas bacterianas. A pureza das proteínas recombinantes foi verificada por um SDS-PAGE 12%.

4.8- Cultura de PBMC e avaliação de citocinas

Para a cultura de PBMC, as células foram separadas por densidade através da centrifugação em Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala Sweden), e cultivado em meio RPMI 1640, com adição de 20% de soro fetal bovino inativado, 2mM de L-glutamina, 200 U/mL

de penicilina, 100 µL de estreptomicina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sódio e aminoácidos não essenciais 1x. Em seguida, as células (1×10^7) foram colocadas em placa de cultura de tecido com o fundo plano contendo 48 poços (Costar, Cambridge, MA, USA), e incubadas sozinhas em meio ou separadamente estimuladas por cada uma das proteínas recombinantes (rHRF, rLiHyD, rLiHyT, rLiHyV, e rLiHyp6; 10 µg/mL, cada) em meio de cultura. PBMC foram incubados por 5 dias a 37°C, em 5% de CO₂. A proteína rA2 e o SLA *L. infantum* (10 e 25 µg/mL, respectivamente) foram usados como controles. Após, os sobrenadantes foram coletados e os níveis de IFN-γ IL-10 foram mensuradas por ELISA de captura, por meio do uso de kit comerciais (Human IFN-γ n IL-10 ELISA Sets, BD Biosciences, USA), conforme instruções do fabricante. Os resultados foram interpolados na curva padrão usando citocinas recombinantes e expressos em picogramas por mililitro (pg/mL). A sensibilidade de detecção para IFN-γ IL-10 foi de 1,5 e 3,5 pg/mL, respectivamente.

4.9- Avaliação da resposta humoral

Para análise da resposta humoral foi utilizado soros de pacientes com diagnóstico de Leishmaniose visceral oriundos de área endêmica para a doença (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), tendo sido a coleta realizada durante a sua internação na Santa Casa de BH (n=30, incluindo 17 homens e 13 mulheres, com idade entre 22 a 58 anos). Teve também a coleta de soro do grupo controle que consistiu de indivíduos saudáveis residentes em área endêmica de LV (Belo Horizonte) sendo que gênero e idade foram pareados (n=30, incluindo 19 homens e 11 mulheres, com idade entre de 19 a 49 anos) e área não endêmica (n=15, incluindo 9 homens e 6 mulheres, com idade entre 23 a 56 anos, Poços de Caldas, MG, Brasil). Para avaliação da reação cruzada dos antígenos, amostras de soro de pacientes com doença de Chagas (n=30, incluindo 22 homens e 8

mulheres, com idade entre 25 e 62 anos), paracoccidiodomicose (n=4, 2 homens e 2 mulheres com idade entre 23 e 49 anos), hanseníase (n=20, com 12 homens e 8 mulheres, com idade entre 20 e 49 anos) e aspergilose (n=8, incluindo 5 homens e 3 mulheres, com idade entre 28 e 63 anos) foram também coletadas.

Com essas amostras os ensaios de ELISA, curvas de titulação prévias foram realizadas para determinar a melhor concentração do SLA e das proteínas recombinantes, bem como a melhor diluição das amostras de soro dos pacientes e dos conjugados anti-IgG humano ligados à enzima peroxidase utilizados. Placas de microtitulação de 96 wells (JetBiofil[®], Belo Horizonte) foram sensibilizadas com as proteínas rHRF, rLiHyD, rLiHyT, rLiHyV, e rLiHyp6, nas concentrações de 0.5, 0.5, 1.0, 0.5, e 1.0 µg/mL, respectivamente, ou com antígenos controles rA2 e SLA *L. infantum*

na concentração de 1.0 µg por well, em ambos os casos, diluídos em 100 µL de *coating buffer* (50 mM tampão carbonato), pH 9.6. Após, as placas foram incubadas por 16 horas a 4°C. Após esse procedimento, foi realizado o bloqueio dos sítios livres usando 250 µL de solução bloqueio (5% de leite em pó desnatado diluído em PBS 1x mais Tween 20 0,05%), por 1 h e a 37°C. Após lavar as placas por 7 vezes com PBS-T (PBS 1x mais Tween 20 0,05%), 100 µL de cada amostra de soro dos diferentes grupos (diluída 1:400 em PBS 1x) foi adicionada e incubada por 1 h a 37°C. Então, as placas foram lavadas 7 vezes com PBS-T e incubada com anti-humano IgG total e subclasses de anticorpos IgG1 e IgG2 (1:10.000; 1:5.000 e 1:10.000, catálogos 156260, 12513 e 15635, Sigma- Aldrich, USA, respectivamente, todos diluídos em PBS-T), por 1 h e a 37°C. Após lavar as placas 7 vezes com PBS-T, as reações foram desenvolvidas pela incubação com 100 µL por well da solução constituída de H₂O₂, 2 mg orto-fenilenediamina (OPD) e 10 mL de tampão citrato-fosfato, pH 5.0, por 30 min no escuro, e a reação foi interrompida com a adição de 25 µL de solução de H₂SO₄ 2 N. A densidade óptica foi lida no leitor de microplacas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada), a 492 nm. Amostras foram usadas no mesmo dia com os mesmos reagentes visando reduzir a variação experimental e interferência na interpretação dos dados. Adicionalmente, controles foram incluídos em todas as placas.

4.10- Análise imunológica de pacientes em tratamento

Para a busca de biomarcadores imunológicos de LV baseada em proteínas recombinantes, amostras de sangue foram coletadas antes e seis meses após o fim do tratamento com anfotericina B lipossomal (United Medical United Medical Ltda., São Paulo SP, Brasil). Esses indivíduos (n=7, incluindo 5 homens e 2 mulheres com idade entre 27 e 59 anos) desenvolveram a forma sintomática da infecção, com diagnóstico realizado pela identificação de *L. infantum* kDNA pela técnica de PCR por Kiz D t tTM T t. Todos os pacientes foram submetidos ao mesmo regime terapêutico usando dose de 5 mg/kg de anfotericina B lipossomal por 7 dias, e nenhum deles apresentava outras infecções ou doenças preexistentes. Adicionalmente, quando todos esses pacientes tiveram seus tratamentos terminados, não foi encontrada amostra de DNA do parasito em aspirados de medula, de forma a se conjecturar que os indivíduos estavam livres da doença.

4.11- Avaliação sorológica em pacientes antes e após o tratamento

Para avaliação da produção de subclasses de IgG1 e IgG2 em pacientes com LV antes e após o tratamento, ensaios de ELISA foram realizados e os níveis de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2 foram quantificadas nas amostras de soro. Ensaios sorológicos foram descritos anteriormente (Subitem 4.8).

4.12- Análise estatística

Os resultados foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0) e analisados usando GraphPad PrismTM (versão 6.0 para Windows). Os limites inferiores de positividade (cut-off) para os antígenos diagnósticos foram estabelecidos para uma proporção máxima de similaridade usando curvas ROC. As curvas foram traçadas com os valores obtidos nas amostras de pacientes com LV (n=30) versus aqueles dos grupos de controle não infectados (n=45), que foram compostos por soros de indivíduos que vivem em áreas endêmicas ou não endêmicas de doença. A capacidade de diagnóstico de cada antígeno foi medida avaliando sua sensibilidade, especificidade e intervalos de confiança

de 95% (IC 95%). O teste t de Student não-pareado foi utilizado para a comparação entre os grupos e diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,05$.

5- RESULTADOS

5.1- Ensaios diagnósticos empregados na identificação de casos de leishmaniose visceral humana

Nesse estudo, a reatividade sorológica das proteínas rHRF, rLiHyD, rLiHyT, rLiHyV, e rLiHyp6, que foram mostradas antigênicas na LV canina em estudos prévios, foi avaliada com vistas ao sorodiagnóstico da LV humana. Para os ensaios, amostras de soros de pacientes com LV, bem como de indivíduos sadios que vivem em áreas endêmicas ou não endêmicas da doença, soros de pacientes com doença de Chagas, paracoccidiodomicose, hanseníase e aspergilose foram utilizados. Das proteínas testadas, os antígenos rHRF, rLiHyD e rLiHyT foram aqueles que apresentaram os melhores resultados, com valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 96,7%, respectivamente. Os valores de sensibilidade para rLiHyV e rLiHyp6 foram de 70,0% e 33,3%, respectivamente, e os valores de especificidade foram de 96,7%.

Para os antígenos rA2 e SLA *L. infantum*, os valores de sensibilidade foram de 53,3% e 46,7%, respectivamente (Tabela 1). Todos os pacientes com LV apresentaram valores de absorbância acima do ponto de corte, quando rHRF, rLiHyD e rLiHyT foram usados como antígenos nas placas (Fig. 5). Por outro lado, usando rLiHyV, rLiHyp6, rA2 ou SLA, um menor número desses pacientes foi corretamente identificado. Com o objetivo de avaliar o perfil de subclasses de IgG específicas às proteínas nos soros de pacientes com LV, os níveis de IgG1 e IgG2 foram investigados. Novamente, rHRF, rLiHyD e rLiHyT apresentaram níveis mais elevados de IgG2 em comparação aos valores de IgG1, enquanto que usando rLiHyV e rLiHyp6, uma resposta mista das subclasses foi encontrada (Fig. 6). Por outro lado, ao usar rA2 e SLA como antígenos, encontrou-se uma maior identificação de IgG1, quando comparada aos valores de IgG2.

A tabela mostra a sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes utilizadas em testes de diagnóstico de pacientes com leishmaniose visceral bem como para avaliação de reação cruzada com os soros de pacientes com doença de chagas, paracoccidiodomicose, hanseníase, aspergilose e indivíduos sadios de áreas endêmicas e não endêmicas.

As proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT: Sensibilidade de 100% e especificidade de 96,7%. rLiHyV sensibilidade de 70,0% e especificidade de 96,7%. rLiHyp6 sensibilidade de

33,3% e especificidade de 96,7%. rA2 sensibilidade de 53,3% e especificidade de 96,7%.
SLA *L. infantum*, sensibilidade de 46,7% e especificidade de 96,7%.

Tabela 1. Avaliação da sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes.

Antígeno	AUC	P valor	Cut-off	Se(%)	95%CI	Sp(%)	95%CI	LR
rHRF	1.0	< 0,0001	> 0.2430	100	88.4-100	96.7	82.8-99.9	30
rLiHyD	1.0	< 0,0001	> 0.3330	100	88.4-100	96.7	82.8-99.9	30
rLiHyT	1.0	< 0,0001	> 0.5985	100	88.4-100	96.7	82.8-99.9	30
rLiHyV	0.84	< 0,0001	> 0.7888	70.0	50.6-85.3	96.7	82.8-99.9	21
rLiHy6	0.83	< 0,0001	> 0.7328	33.3	17.3- 52.8	96.7	82.8- 99.9	10
rA2	0.89	< 0,0001	> 0.6190	53.3	34.3- 71.7	96.7	82.8-99.9	16
SLA <i>L. infantum</i>	0.86	< 0,0001	> 0.8090	46.7	28.3- 65.7	96.7	82.8- 99.9	14

Figura 5. Absorbância após a reação dos anticorpos, presentes em soros de pacientes, com antígenos utilizados. A figura apresenta valores de absorbância medidos após a reação dos anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose visceral, sadios de área endêmica, sadios de área não endêmica, com doença de chagas, hanseníase, aspergilose e paracoccidiodomicose. Nela as rHRF, rLiHyD e rLiHyT identificou todas as amostras de LV. rLiHyV, rLiHy6, rA2 ou SLA não foram capazes de identificar todas as amostras de LV e identificaram amostras de outras doenças.

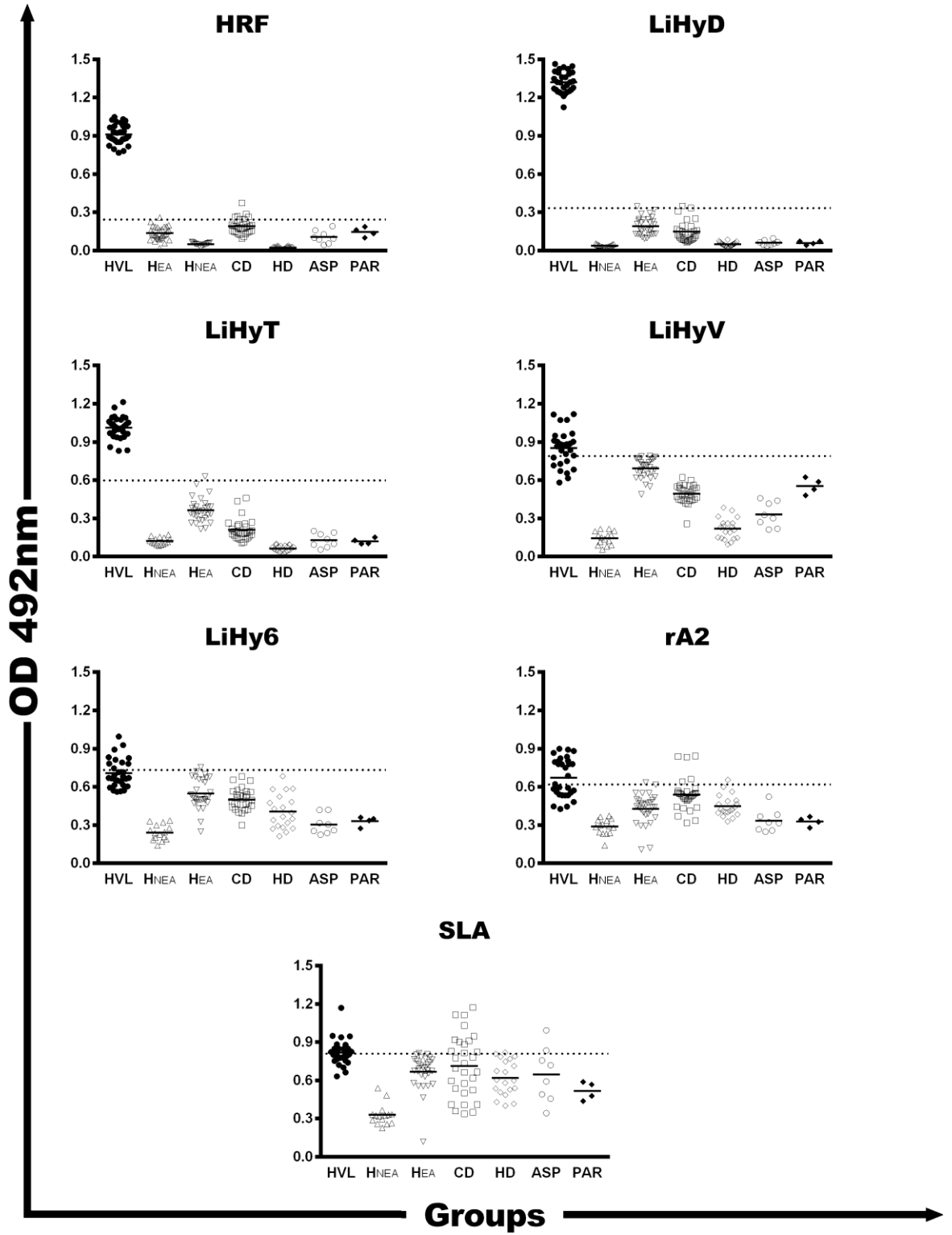
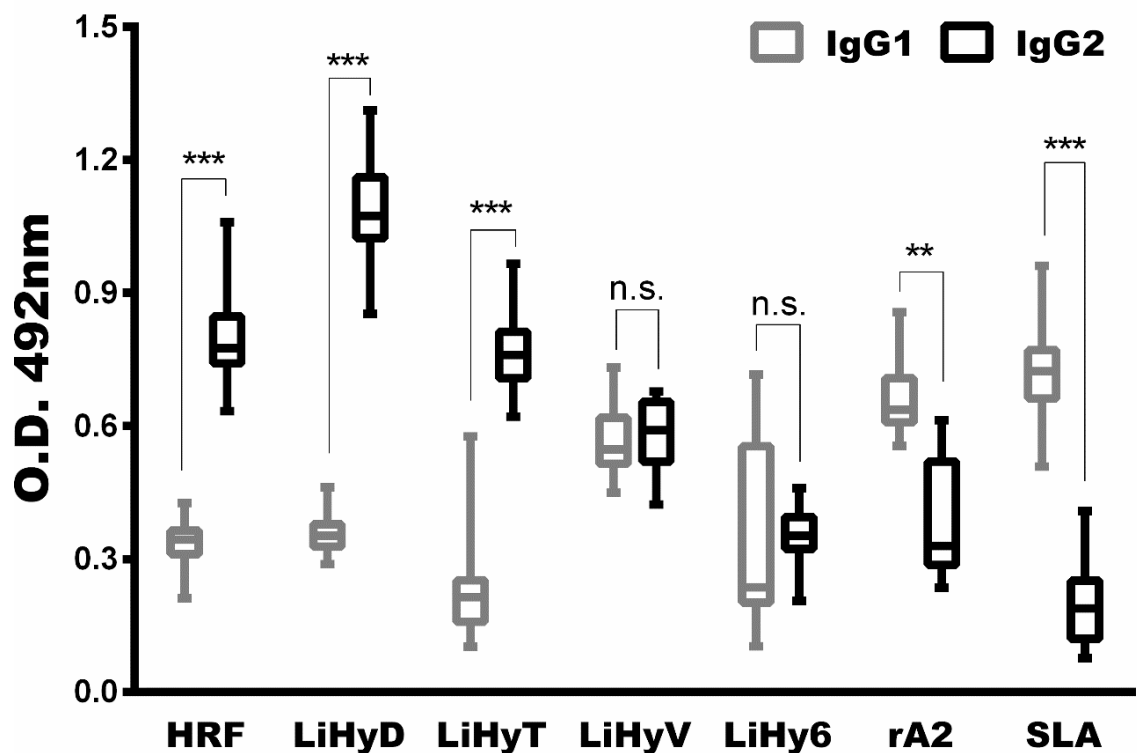


Figura 6. Reação das imunoglobulinas dos subtipos G1 e G2 frente aos antígenos. Esta figura mostra o perfil de subclasse de IgG presentes nas amostras do soro dos pacientes com LV que reagiram com as proteínas recombinantes. Sendo possível observar que as rHRF, rLiHyD e rLiHyT foram mais reconhecidos por IgG2 enquanto que rLiHyV e rLiHyp6 apresentaram uma resposta mista. rA2 e SLA foram melhor reconhecidos por IgG1.



5.2- Resposta imune em pacientes com leishmaniose visceral antes e após o tratamento

As proteínas recombinantes foram então utilizadas para estimular PBMCs coletados de pacientes com LV, antes e seis meses após o tratamento, com o objetivo de avaliar a produção específica das citocinas IFN- γ e IL-10. Também, os níveis de subclasses IgG1 e IgG2 anti-proteína foram avaliados nos soros dos pacientes. Em relação aos resultados obtidos, quando as proteínas rHRF, rLiHyD, rLiHyT e rLiHyV foram utilizadas como estímulos, foram encontrados níveis mais elevados de IFN- γ em relação aos de IL-10 em pacientes tratados em comparação com os níveis obtidos antes do tratamento. Usando rLiHyp6, rA2 e SLA *L. infantum* como estímulos, foi encontrada

uma produção similar de IFN- γ e IL-10 antes e após o tratamento (Fig. 7). Avaliando as subclasses de IgG1 e IgG2 nos soros dos pacientes usando as proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT como antígenos, uma significativa redução nos níveis de IgG total e IgG1 foi encontrada após o

tratamento (Fig. 8A e 8B), enquanto a produção de IgG2 foi maior (Fig. 8C). Utilizando rLiHyV, rLiHyp6, rA2 ou SLA como antígenos nos ensaios ELISA, valores semelhantes de IgG total, IgG1 e IgG2 foram encontrados antes e após o tratamento.

Figura 7. Produção de IFN- γ e IL-10 por PBMC estimuladas por antígenos antes e após o tratamento medicamentoso. Os gráficos abaixo mostram que em estímulo de PBMC de pacientes, antes e 6 meses após o tratamento, usando rHRF, rLiHyD, rLiHyT e rLiHyV como antígenos, foram encontrados níveis mais elevados de IFN- γ em relação aos de IL-10 em pacientes tratados em comparação com os níveis obtidos antes do tratamento. Quando utilizado rLiHyp6, rA2 e SLA

L. infantum como antígenos, foi encontrada uma produção similar de IFN- γ e IL-10 antes e após o tratamento.

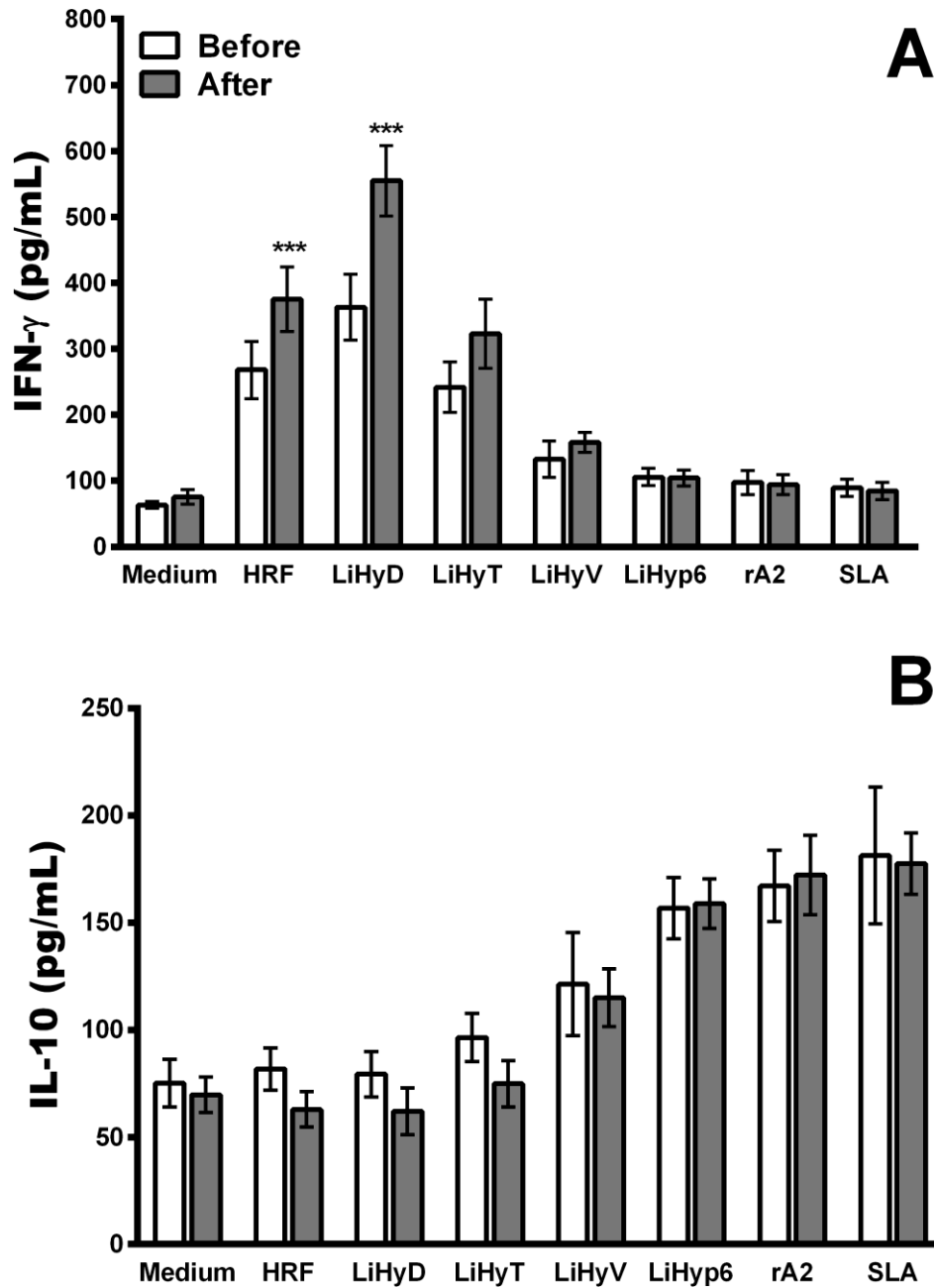
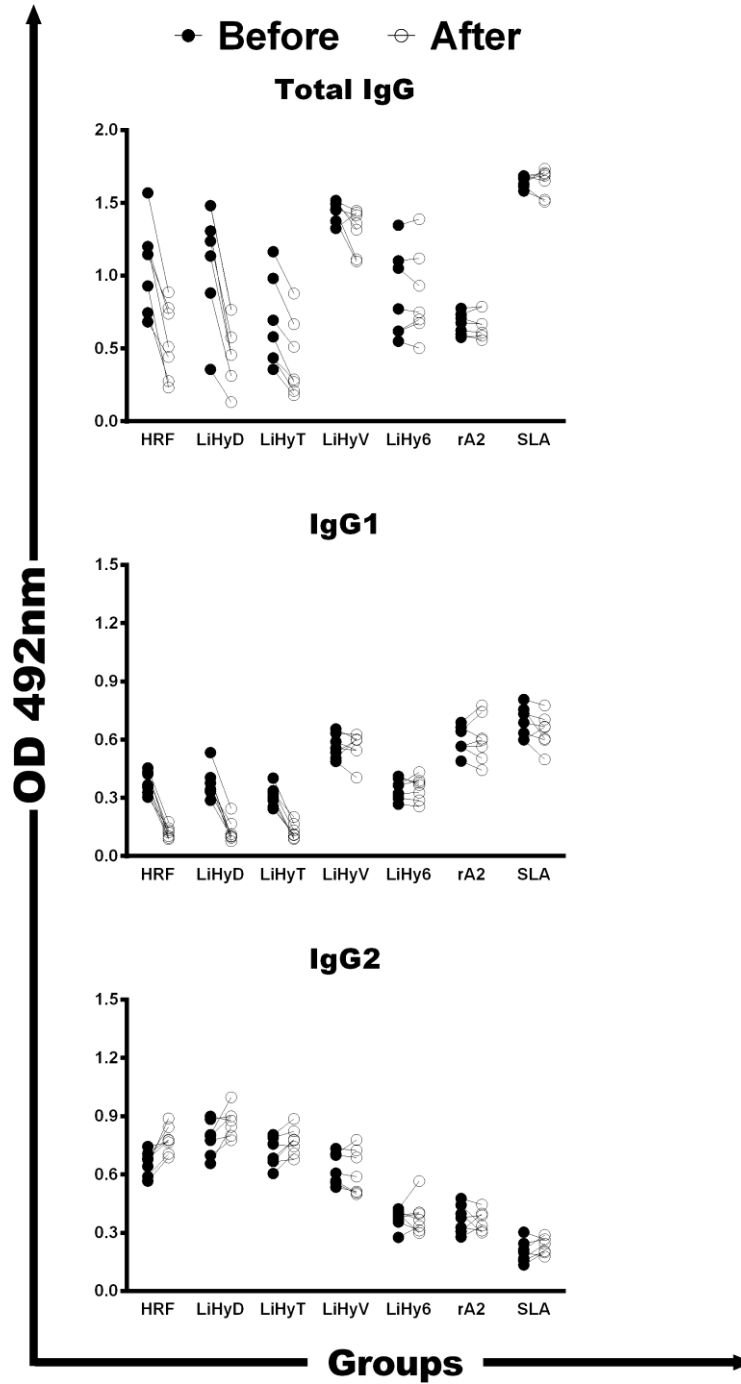


Figura 8. Produção de IgG total, IgG1 e IgG2 antes e após o tratamento medicamentoso. Os gráficos abaixo mostram a quantidade de IgG total e suas subclasses (IgG1 e IgG2) encontradas no soro de pacientes com LV antes e 6 meses após o tratamento medicamentoso. Para isso, as proteínas rHRF, rLiHyD, rLiHyT, rLiHyV, rLiHy6, rA2 e o SLA foram utilizadas como antígenos na placa de ELISA. Em consequência disso, foi possível observar que, usando as proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT como antígenos, uma significativa redução nos níveis de IgG total e IgG1 (A e B)

foi encontrada após o tratamento enquanto a produção de IgG 2 (C) foi maior. Usando rLiHyV, rLiHy6, rA2 ou SLA como antígenos, valores semelhantes de IgG total, IgG1 e IgG2 foram encontrados antes e após o tratamento.



6- DISCUSSÃO

O tratamento da LV se baseia, principalmente, na quimioterapia, entretanto, os efeitos tóxicos das fármacos, o alto custo das formulações lipossomais e/ou o surgimento de cepas resistentes têm sido desafios a serem enfrentados. O desenvolvimento de uma vacina contra a LV humana é possível, uma vez que a cura é associada com uma imunidade do tipo Th1 contra a reinfeção. Além disso, muitos indivíduos imunocompetentes, quando expostos à *Leishmania*, desenvolvem uma infecção assintomática ou subclínica, em vez de uma forma aguda e fatal da doença (Chamakh-Ayari R., *et. al.*, 2014).

Durante a evolução da doença, observa-se uma redução da resposta imune celular, caracterizada pela redução da atividade de PBMCs em resposta aos antígenos dos parasitos, bem como uma redução na produção de citocinas tais como IFN- γ e IL-12, dentre outras (Peruhype-Magalhães V. *et. al.*, 2005). Por outro lado, PBMCs de pacientes tratados e curados usualmente produzem citocinas pró-inflamatórias, quando as células são estimuladas com antígenos dos parasitos (Singh OP, *et. al.*, 2012)

Sabe-se que o IFN- γ induz à produção de óxido nítrico e outros compostos por células fagocíticas infectadas com *Leishmania*, que são ativadas e matam os parasitos fagocitados, auxiliando assim no controle da replicação dos mesmos e da infecção. Por outro lado, a IL-10 é uma citocina imunossupressora sendo encontrada em níveis elevados em pacientes com a doença ativa (Caldas A., *et. al.*, 2005). Tais pacientes apresentam também expressão aumentada de mRNA desta citocina em órgãos alvo, tais como o baço e a medula óssea (Gutam S., *et. al.*, 2011). Tais achados têm desafiado a noção prevalente de que a resposta Th1 defeituosa possa ocorrer em pacientes com LV ativa, sugerindo que o perfil de citocinas Th2 possa refletir de maneira mais fidedigna a imunidade associada com o desenvolvimento da doença ativa. De qualquer maneira, essas citocinas são associadas à resistência ou suscetibilidade à LV, e podem assim serem consideradas como alvos potenciais para intervenção terapêutica contra a doença Ghalib HW., *et al.*, 1993; Castelhana LR., *et. al.*, 2009; Ansari NA., *et al.*, 2008).

Através dos resultados encontrados no presente estudo, foi possível inferir que três das cinco proteínas recombinantes testadas (HRF, LiHyD e LiHyT) apresentaram bons resultados para o monitoramento de pacientes com LV antes e após o tratamento. Foi encontrada uma resposta Th1 polarizada, baseada na maior produção de IFN- γ e baixos

níveis de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de PBMCs de pacientes tratados, que foram estimulados com tais antígenos, quando comparados aos valores obtidos antes do tratamento, o que vai ao encontro do que foi exposto por Cillari *et al.*, 1995 e Duthie *et al.*, 2014, que detectaram níveis menores de IL-10 em pacientes com LV e que foram tratados. Da mesma forma, foi mostrado por Gasim *et al.*, 1998, que estudaram o perfil imunológico de pacientes com LV, a associação da doença ativa com um aumento da presença de IL-10, enquanto que naqueles com propensão a desenvolver a doença mais leve, os níveis dessa citocina foram menores. Assim como Bhattacharya, *et al.* (2016) que acompanharam 20 pacientes com LV ativa e detectaram também níveis elevados de IL-10 secretados por células T CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺. A produção do isotipo IgG2 foi maior após o tratamento, em comparação com os níveis de IgG1 encontrados específicos às proteínas HRF, LiHyD e LiHyT. Portanto, tais achados corroboram a associação de um perfil imune de Th1 com a cura da LV. Por outro lado, as proteínas rLiHyV e rLiHyP6 mostraram uma resposta mista Th1:Th2, uma vez que os valores de IFN- γ e IL-10 foram semelhantes antes e após o tratamento, assim como os níveis dos isotipos IgG1 e IgG2.

Portanto, pode-se afirmar através dos resultados obtidos pelo uso das proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT que essas estimularam uma maior produção de IFN- γ e um aumento dos níveis da subclasse IgG2 nos pacientes tratados, demonstrando o desenvolvimento de uma resposta Th1 específica. Com isso, foi levantada a hipótese de que as avaliações celulares e humorais usando tais proteínas poderiam ser usadas no biomonitoramento do tratamento da doença humana.

Ainda utilizando as proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT como antígenos marcadores da resposta humoral, foi possível verificar a redução significativa dos níveis de IgG e do isotipo IgG1, na comparação com as coletas realizadas antes e seis meses após o tratamento dos pacientes, o que vai ao encontro do que foi detectado por Bhattacharyya *et al.*, 2014, que demonstraram redução dos níveis de IgG1, seis meses após o tratamento da LV em pacientes da Índia e Sudão. Assim, é possível reforçar a suposição de que as proteínas utilizadas como antígenos são promissoras para a verificação da cura clínica dos pacientes por meio de sorologia.

Os achados desse estudo corroboram com dados da literatura que revelam que, na imunidade humoral na leishmaniose humana, células T exercem controle diferencial sobre o equilíbrio dos isotipos de imunoglobulinas e um dos mecanismos por trás dessa troca de classes seria baseado na presença de citocinas pró- e anti-inflamatórias

(Mukhopadhyay D., *et al.*, 2012; Schultz CL., *et al.*, 1991). Neste contexto, a IL-10 induz a um aumento na produção de IgG1 e IgG3, enquanto IL-4 e IL-13 de células T ativadas causam a troca para IgG4 e IgE (Gascan H *et al.*, 1991). IFN- γ , assim como IL-6, induz a um aumento na produção de IgG2 (Kawano Y., *et al.*, 1994; Redhu NS., *et al.*, 2006). Os resultados do presente estudo usando rHRF, rLiHyD e rLiHyT mostraram maior produção de IFN- γ e um aumento dos níveis de subclasse IgG2, demonstrando assim o desenvolvimento de uma resposta com perfil Th1 nos pacientes tratados. Nossa hipótese é que -6, induz a um aumento na produção de IgG2 (Kawano Y., *et al.*, 1994; Redhu NS., *et al.*, 2006). Os resultados do presente estudo usando rHRF, rLiHyD e rLiHyT mostraram maior produção de IFN- γ e um aumento dos níveis de subclasse IgG2, demonstrando assim o desenvolvimento de uma resposta com perfil Th1 nos pacientes tratados. Nossa hipótese é que avaliações celulares e humorais empregando as proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT podem ser consideradas para o monitoramento do tratamento da LV humana.

Coelho *et al.* (2012) descreveram que proteínas da *Leishmania* spp. reagem com anticorpos em soros de cães com LV e podem ser consideradas antigênicas, de forma a serem utilizadas como marcadores diagnósticos e/ou candidatos vacinais contra a doença. No presente estudo, as proteínas HRF, LiHyD, LiHyT, LiHyV e LiHyp6, que foram encontradas conservadas entre diferentes espécies de *Leishmania* e com seus principais epitopos de células T e B conservados, foram testadas como antígenos diagnósticos para a LV humana. Há de se destacar que estudos prévios mostraram a eficácia desses antígenos recombinantes como marcadores sorológicos para a LV canina (Lage D.P., *et al.*, 2016; Martins VT., *et al.*, 2015; Coelho EAF., *et al.* 2003; Coelho EA., *et al.*, 2016).

Nos testes sorológicos, as proteínas rHRF, rLiHyD e rLiHyT mostraram ser reconhecidas por todos os soros de pacientes com LV, mas não apresentaram reatividade quando testados contra soros de indivíduos saudáveis ou de pacientes com doença de Chagas, bem como com aqueles diagnosticados com paracoccidiodomicose, hanseníase ou aspergilose. Estes resultados são promissores, e futuros estudos podem explorar o potencial dessas moléculas recombinantes, ou de seus peptídeos sintéticos, para a melhoria do sorodiagnóstico da doença humana. Por outro lado, os antígenos rLiHyV, rLiHyp6, rA2 e SLA não mostraram resultados tão satisfatórios, e novos estudos devem ser realizados para confirmar ou descartar seu papel para um sorodiagnóstico sensível e específico da LV.

O diagnóstico sorológico utilizando o antígeno rK39 tem sido empregado na prática clínica (Meddeb-Garnaoui A., *et. al.*, 2010). No entanto, estudos relataram que este antígeno não é tão eficiente, exibindo reatividade cruzada com doenças relacionadas às leishmanioses, além de reatividade em indivíduos não infectados e que vivem em áreas endêmicas da doença, levando a resultados falso-positivos e dificultando a especificidade dos testes (Gadisa E., *et. al.*, 2012; Aronson NE., 2017; Costa LE., *et. al.*, 2017). Como o kit comercial foi desenvolvido para detectar anticorpos específicos às proteínas da espécie *L. donovani*, resultados falso-negativos podem ser encontrados quando soros de pacientes infectados com *L. infantum* são testados (Duarte MC., *et.al.*, 2016a; Costa LE., *et. al.*, 2017; Mohammadiha A., *et. al.*, 2013).

O presente estudo é o primeiro empregando antígenos recombinantes selecionados na LV canina para aplicação no sorodiagnóstico da LV humana, bem como no monitoramento celular e humoral da resposta terapêutica contra a doença. Tais proteínas se mostraram imunogênicas em PBMCs de pacientes e se colocam como possíveis alvos vacinais contra a doença humana. Como fatores limitantes, outras classes de soros tais como de pacientes com malária, tuberculose, toxoplasmose, citomegalovírus, dentre outros, não foram utilizadas. Além disso, o baixo número de pacientes com LV avaliados antes e após o tratamento e a ausência de uma avaliação imune em pacientes que foram tratados e não foram curados devem ser considerados, e certamente serão necessários de serem realizadas a fim de se resolver tais questões.

7- CONCLUSÃO

As proteínas recombinantes HRF, LiHyD e LiHyT apresentam-se como promissores antígenos para testes diagnósticos da leishmaniose visceral, já que foram reconhecidas pelos anticorpos presentes em todas amostras de pacientes com LV e não apresentaram reação cruzada.

As proteínas recombinantes HRF, LiHyD e LiHyT apresentam-se como promissores biomarcadores da avaliação da resposta imunológica de pacientes tratados, visto que as mesmas foram capazes de induzir uma resposta com perfil Th1 com maior produção de IFN- γ em PBMC de pacientes tratados quando comparados com aqueles não tratados e, serem detectadas por IgG2 presentes em amostras de soro de pacientes 6 meses após o término do tratamento.

8- PROPOSIÇÕES

- Testar as proteínas recombinantes estudadas em amostras de coorte de região endêmica (Araçuaí, Minas Gerais, Brasil) da doença.
- Prosseguir com estudos sobre o potencial das proteínas recombinantes como antígenos em testes diagnósticos.
- Realização de estudo de polimorfismo genético dos pacientes da região de Araçuaí, objetivando identificar as causas da ocorrência de casos assintomáticos e sintomáticos em pessoas expostas à infecção em uma mesma região.
- Realizar estudos mais aprofundados sobre a capacidade das proteínas recombinantes induzirem a resposta imunológica para a detecção de marcadores de cura da doença, podendo ser utilizado também citometria de fluxo em PBMC.
- Realizar o acompanhamento dos pacientes por mais tempo após o tratamento, correlacionando os resultados dos testes com biomarcadores e avaliação clínico laboratorial
- Avaliar por métodos imunológicos e/ou de bioinformática possíveis motivos das proteínas rHRF, rLiHyD e LiHyT terem apresentado melhores resultados.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One* 2012; 7 e35671.
- Ansari NA, Saluja S, Salotra P. 2006. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala-azar. *Clin Immunol* 119:339–345.
- Badaro R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG (1996) Rk39, a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Inf Dis* 173:758–761.
- Balasegaram M, Ritmeijer K, Lima MA, Burza S, Genovese GO, Milani B, Gaspani S, Potet J, Chappuis F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012.
- Bandyopadhyay S, Chatterjee M, Pal S, Waller RF, Sundar S, Mc Conville MJ, Mandal C. 2004. Purification, characterization of oacetylated sialoglycoconjugates-specific IgM, and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis and follow-up of Indian visceral leishmaniasis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 50:15–24.
- Barão SC, Fonseca Camargo-Neves VL, Resende MR, Silva LJ. Human asymptomatic infection in visceral leishmaniasis: a seroprevalence study in an urban area of low endemicity. Preliminary results. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:1051–3.
- Bhattacharya P, Ghosh S, Ejazi Sa, Rahaman M, Pandev K, Ravi Das VN, Das P, Goswami RP, Saha B, Ali . Induction of IL-10 an TGF- β f om CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells Correlates with Parasite load in Indian Kala-azar Patients Infected woyth *Leishmania donovani*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Feb 1;10(2): e0004422. Doi: 10.1371/ journal.pntd 0004422.
- Bhattacharyya T, Ayandeh A, Falconar AK, Sundar S, El-Safi S, Gripenberg MA, Bowes DE, Thunissen C, Singh OP, Kumar R, Ahmed O, Eisa O, Saad A, Silva Pereira S, Boelaert M, Mertens P, Miles MA. IgG1 as a potential biomarker of post-chemotherapeutic relapse in visceral leishmaniasis, and adaptation to a rapid diagnostic test. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 23;8(10):e3273.
- Brasil: Minsitério da Saúde: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>. Acesso em dezembro de 2017.
- Buxbaum LU, Scott P. Interleukin 10- and Fcgamma receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun*. 2005;73(4):2101-8.

- Caldas AJ, Costa JM, Silva AA, Vinhas V, Barral A. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:21-8.
- Carvalho PB, Arribas MAG, Ferreira EI. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy?
Braz. J. Pharmac. Sci. v. 36, p. 69-96. 2000.
- Center for Disease Control and Prevention.
www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html Acesso em 10 de novembro de 2018.
- Coelho EA, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Tavares CA, Soto M, Goulart LR. Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015 Jul-Ago; 48(4): 370-9. Doi: 10.1590/0037-8682-0096-2015.
- Coelho EAF, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlashewski G, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect. & Immun.* v. 71, n. 7, p. 3988-94, 2003.
- Coelho VT, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, Soto M, Santoro MM, Tavares CA, Fernandes AP, Coelho EA. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(1):e1430.
- Coelho EA, Costa LE, Lage DP, Martins VT, Garde E, de Jesus Pereira NC, Lopes EG, Borges LF, Duarte MC, Menezes-Souza D, de Magalhães-Soares DF, Chávez-Fumagalli MA, Soto M, Tavares CA. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016 15;215:63-71.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Ao Microbiol* 5:873–882.
- Cillari E, Vitale G, Arcoleo F, D'Agostino P, Mocciaro C, Gambino G, Malta R, Stassi G, Giordano C, Milano S, et al. *In vivo* and *in vitro* cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 1995;7(7):740-5.
- Costa ASA, Costa GC, Aquino DMC, Mendonça CRR, Barral A, Barral-Netto M, Caldas Ade J. 2012. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:735–739.

- Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008 1;180(9):5771-7.
- Crescente JAB, Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:1250-6.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305-18.
- Duthie MS, Guderian J, Vallur A, Bhatia A, Lima-dos-Santos P, Vieira-de-Melo E, Ribeiro-de-Jesus A, Todt M, Mondal D, Almeida R, Reed SG. 2014. Alteration of the serum biomarker profiles of visceral leishmaniasis during treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:639–649.
- Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* v. 146, n. 3-4, p. 235–241. 2007.
- Gama ME, Costa JM, Gomes CM, Corbett CE. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 99, n. 8, p. 889-93. 2004.
- Gardinassi LG, Dotz V, Ederveen AH, Almeida RP, Costa CHN, Costa DL, Jesus AR, Mayboroda OA, Garcia GR, Wuhler M, Santos IKFM. Clinical severity of visceral leishmaniasis is associated with changes in immunoglobulin G Fc n-glycosylation. *mBio.* 2014, vol.5, 1-12.
- Gasim S, Elhassan AM, Khalil EA, Ismail A, Kadaru AM, Kharazmi A, Theander TG. 1998. High levels of plasma IL-10 and expression of IL-10 by keratinocytes during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 111: 64–69.
- Gautam S, Kumar R, Maurya R, Nylén S, Ansari NT, et al. (2011) IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 204: 1134–1137.
- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 36, n. 1, p. 71-80. 2003.
- Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* v. 7, n. 3, p. 338-349. 2004.
- Goto Y, Omachi S, Sanjoba C, Matsumoto Y. Short Report: Elevation of Serum B-Cell Activating Factor Levels During Visceral Leishmaniasis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 91(5), 2014, 912–914.
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to

- disease control. *Int J Parasitol.* v. 35, n.11-12, p. 1169-80. 2005.
- Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 6, p. 230–50. 1993.
- Hasker E, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Ostyn B, Kansal S, Singh RP, Singh OP, Chourasia A, Singh AK, Shankar R, Wilson ME, Khanal B, Rijal S, Boelaert M, Sundar S. Strong association between serological status and probability of progression to clinical visceral leishmaniasis in prospective cohort studies in India and Nepal. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014, 8:1-8.
- Hughes S, Kelly P (2006) Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. *Parasite Immunol* 28: 577–588.
- Jeronimo S, Teixeira M, Sousa A, Thielking P, Pearson R, et al. (2000) Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: Long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 30: 608–609.
- Kane MM, Mosser DM. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol.* v. 7, n. 1, p. 26-31. 2000.
- Karkjian KM, Mahmutovic AJ, Kellar KL, Haque R, Bern C, Secor WE. 2006. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytom A* 358:353–35.
- Katara GK, Ansari NA, Verma S, Ramesh V, Salotra P. 2011. Foxp3 and IL-10 expression correlates with parasite burden in lesional tissues of post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) patients. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1171.
- Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, Taheri E, Kiany S, Javadian MH. 2009. Increased levels of IL- 10, IL-12, and IFN-gamma in patients with visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis* 13:44–46.
- Kip AE, Balasegaram M, Beijnen JH, Schellens JH, Vries PJ, Dorlo TP. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1):1-14.
- Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Garde E, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Roatt BM, Tavares CA, Soto M, Coelho EA. Prophylactic properties of a *Leishmania*-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology.* 2015; 37 (12): 646-656.
- Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Costa LE, Garde E, Dimer LM, Kursancew AC, Chávez- Fumagalli MA, de Magalhães-Soares DF, Menezes-Souza D, Roatt BM, Machado-de-Ávila RA, Soto M, Tavares CA, Coelho EA. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non- described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2016;115(4):1649-58.
- Liberopoulos E, Kei A, Apostolou F, Elisa M. Autoimmune manifestations in patients

- with visceral leishmaniasis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (2013) 46, 302e305.
- Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Canavaci AM, Martins AM, Lage PS, Lage DP, Duarte MC, Valadares DG, Magalhães RD, Ribeiro TG, Nagem RA, Darocha WD, Régis WC, Soto M, Coelho EA, Fernandes AP, Tavares CA. Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2148.
- Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Duarte MC, Garde E, Costa LE, da Silva VG, Oliveira JS, Magalhães-Soares DF, Teixeira SM, Fernandes AP, Soto M, Tavares CA, Coelho EA. Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* against visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2015a 14;10(9):e0137683.
- Martins VT, Duarte MC, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Coelho CS, de Magalhães-Soares DF, Fernandes AP, Soto M, Tavares CA, Coelho EA. A *Leishmania*-specific hypothetical protein expressed in both promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* employed for the serodiagnosis of, and as a vaccine candidate against, visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2015b 11;8:363.
- Martins VT, Lage DP, Duarte MC, Costa LE, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Menezes-Souza D, Tavares CA, Coelho EA. Cross-protective efficacy from a immunogen firstly identified in *Leishmania infantum* against tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 2016 Feb;38(2):108-17.
- Medeiros IM, Nascimento ELT, Hinrichsen SL. Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). In: DIP- Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.
- Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*. v. 24, n. 8, p. 371–377. 2008.
- Nylén S, Kumar R (2012) Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front Immunol* 3: 251.
- Oliveira CD, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública*. v. 17, n. 5, p. 1231-9. 2001.
- Ostya B, Gidwani K, Khanal B, Picado A, Chappuis F, et al. (2011) Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study. *PloS Negl Trop Dis* 5:e1284.
- Paiva-Cavalcanti M, Morais RC, Pessoa-E-Silva R, Trajano-Silva LA, Gonçalves-de-Albuquerque SC, Tavares DH, Brelaz-de-Castro MC, Silva RF, Pereira VR. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*. 2015; 17;5:31.

- Palatinik-de-Souza CB. Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*. v. 3, n. 69, p. 1-15. 2012.
- Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, et al. (2010) Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e822.
- Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho AO, Prata A, Silva AL, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimarães-Carvalho SF, Ferrari TCA, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R. 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha monocytes are hallmarks of active human visceral leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol* 146:124–132.
- Pitta M, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, et al. (2009) IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala-azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest* 119: 2379–2387.
- Rai AK, Thakur CP, Singh A, Seth T, Srivastava SK, Singh P, Mitra DK. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2012;7(2):e31551.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. v. 7, n. 9, p. 581-96. 2007.
- Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Vitoriano-Souza J, Coura-Vital W, Braga SL, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Lana M, Gontijo NF, Marques MJ, Giunchetti RC, Reis AB. Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. *PLoS One*. 2012;7(11):e49780.
- Romero HD, Silva LDA, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, Alecrim W, Moraes-Souza H, Prata A. 2009. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 81:27–33.
- Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol*. v. 3, n. 11, p. 1041-1047. 2002.
- Saha S, Mazumdar T, Anam K, Ravindran R, Bairagi B, Saha B, Goswami R, Pramanik N, Guha SK, Kar S, Banerjee D, Ali N. 2005. *Leishmania* promastigote membrane antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting for differential diagnosis of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 43:1269–1277.
- Singh P, Gidwani K, Kumar R, Nylén S, Jones SL, Boelaert M, Sacks D, Sundar S. Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by

- cytokine release in whole blood. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012; 19: 961–966.
- Souza AP, Soto M, Costa JML, Boaventura VS, Oliveira CI, Cristal JR, Barral-Netto M, Barral A. 2013. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PloS One* 8:e66110.
- Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S (2011) Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PloS One* 6:e19304.
- Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res* (2012) 110:1065–1078.
- Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. v. 9, n. 5, p. 951-958. 2002.
- Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn*. v. 3, n. 5, p. 657-67. 2003.
- Tesh, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?. *Am J Trop Med Hyg*. v. 52, n. 3, p. 287-92. 1995.
- Vallur AC, Duthie MS, Reinhart C, Tutterrow Y, Hamano S, Bhaskar KRH, Coler RN, Mondal D, Reed SG. 2013. Biomarkers for intracellular pathogens: establishing tools as vaccine and therapeutic endpoints for visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* 20:374–383.
- Van-den-Bogaart E, Talha AB, Straetemans M, Mens PF, Adams ER, Grobusch MP, Nour BY, Schallig HD. Cytokine profiles amongst Sudanese patients with visceral leishmaniasis and malaria co-infections. *BMC Immunol*. 2014 1;15:16.
- Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi S, Ramesh V, Salotra P. 2010. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PloS One* 5:e10107.
- Werneck GL, Costa CH, Carvalho FA, Pires-Cruz MS, Maguire JH, Castro MC. Effectiveness of insecticide spraying and culling of dogs on the incidence of *Leishmania infantum* infection in humans: a cluster randomized trial in Teresina, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 30;8(10):e3172.
- World Health Organization. Leishmaniasis. *Fact sheet*. n. 375. 2015.
- World Health Organization. Leishmaniasis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. 2018
- Zhang WW, Charest H, Ghedin E, Matlashewski G (1996) Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. *Mol Bioch Parasitol* 1996; 78:79–90.

10- APENDICE I

Immunobiology 223 (2018) 303–309



Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/imbio

Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis



Áquila S.B. Portela^a, Lourena E. Costa^a, Beatriz C.S. Salles^a, Mariana P. Lima^a, Thaís T.O. Santos^a,
 Fernanda F. Ramos^a, Daniela P. Lage^a, Vívian T. Martins^a, Rachel B. Caligiorne^b,
 Daniela R. Lessa^b, Fabiana R. Silva^b, Amanda S. Machado^b, Guilherme F. Nascimento^b,
 Isabela S. Gama^a, Miguel A. Chávez-Fumagalli^a, Antonio L. Teixeira^{a,c}, Manoel O.C. Rocha^a,
 Regina L. Rocha^a, Eduardo A.F. Coelho^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte, Rua Domingos Vieira, 590, Santa Efigênia, 30150-240, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA; 1941 East Road, Houston, TX, 77041, USA

11- APENDICE II

CARTA DE ESCLARECIMENTO AOS PACIENTES

PROJETO: Avaliação do Perfil Imunológico de Pacientes com *Leishmaniose Visceral* Internados na Santa Casa Misericórdia de Belo Horizonte

Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

A infecção pelo parasito que provoca a leishmaniose visceral ativa gera uma resposta do nosso organismo que tenta combatê-la, estudos sobre essa resposta podem auxiliar na identificação de meios para a elaboração de vacinas que impedisse das pessoas se infectarem.

Estamos realizando uma pesquisa para avaliar o perfil de resposta imunológica do paciente com leishmaniose visceral nas diversas etapas do tratamento da doença.

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar dessa pesquisa que acontecerá enquanto você estiver em tratamento internado Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte . Durante o período em que estiver em tratamento da leishmaniose visceral você será atendido pela Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte e será acompanhado pelo pesquisador por uma a duas vezes por semana para coleta de sangue para realização de testes que irão dar o perfil da sua resposta imunológica contra o parasito causador da doença. Portanto enquanto você estiver internado no Hospital das Clínicas receberá de uma a duas visitas semanais do pesquisador responsável, além disso, será necessária a coleta de sangue para realização de exames que irá avaliar a sua resposta imunológica.

Esse estudo poderá contribuir para que futuramente seja possível desenvolver uma vacina que impedirá a infecção de outras pessoas pelo parasito causador da leishmaniose. Também sua participação contribuirá para que seja possível melhorar a assistência aos pacientes em tratamento da Leishmaniose visceral na Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidenciais. No entanto, os pesquisadores e, algumas vezes, o Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, poderão ter acesso aos dados. Os resultados desse estudo serão publicados e/ou apresentados em encontros científicos, sendo que, em qualquer publicação, seu nome não será revelado. Sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar dele, ou seu desligamento, não envolverá penalidade ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá desistir de participar em qualquer momento da pesquisa

A participação no estudo poderá lhe proporcionar incômodos como a necessidade de coleta de sangue para a realização dos exames e a possível necessidade de depilação no local onde será colocado o eletrodo para realização do eletrocardiograma.

Você e seu responsável receberão uma via desse documento com conteúdo idêntico ao que você leu ou que leram para você.

CARTA DE ESCLARECIMENTO AOS PACIENTES

S

PROJETO: Avaliação do Perfil Imunológico de Pacientes com *Leishmaniose Visceral* Internados na Santa Casa Misericórdia de Belo Horizonte

u

Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

Acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, explicando a p t o t o ob -Avaliação do Perfil Imunológico de Pacientes com *Leishmaniose Visceral* Internados na Santa Casa Misericórdia de Belo Horizontel. Eu conversei com a farmacêutica Áquila Serbate Borges Portela sobre minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que tenho garantia do acesso ao meu tratamento. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou do meu atendimento neste serviço.

Eu, _____, abaixo assinado, RG-HSC BH _____, dou meu consentimento em participar do estudo sobre

-Avaliação do Perfil Imunológico de Pacientes com *Leishmaniose Visceral* Internados na Santa Casa Misericórdia de Belo Horizontel, após ser informado (a) sobre a pesquisa, ter entendido todos os procedimentos e tirado todas as minhas dúvidas sobre a carta de informação.

Paciente _____

Testemunha _____

Pesquisador _____

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____.

Durante o estudo, caso você tenha alguma dúvida a respeito de seus direitos como participante da pesquisa, ou apresentar qualquer problema médico, você poderá entrar em contato conosco:

Áquila Serbate Borges Portela: (31) 984538986

Regina Lunardi Rocha (31) 999926773

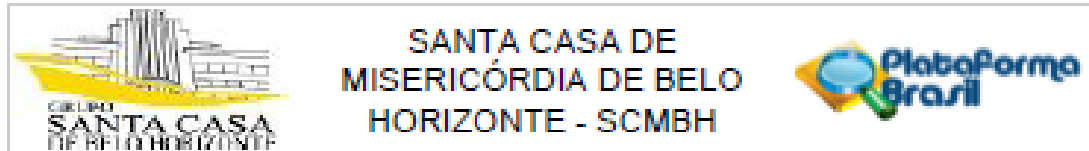
Comitê de Ética da Santa Casa de Belo Horizonte:

Telefone: 31 3238-8933- E-mail:

cepsantacasa@gmail.com Endereço: Rua

Domingos Vieira , 590, Bairro Santa Efigênia

12- ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do Perfil Imunológico de Pacientes com Leishmaniose Visceral Internados na Santa Casa Misericórdia de Belo Horizonte

Pesquisador: Manoel Otávio da Costa Rocha

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60802116.1.0000.5138

Instituição Proponente: SANTA CASA DE MISERICORDIA DE BELO HORIZONTE

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Minas Gerais

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.769.503

Apresentação do Projeto:

O estudo consiste numa avaliação longitudinal do perfil imunológico de pacientes com Leishmaniose Visceral em tratamento, no qual serão realizadas três coletas de sangue periférico em distintos tempos terapêuticos (antes do tratamento, durante e após o término do tratamento).

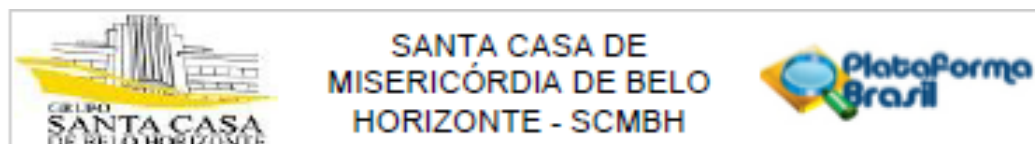
Metodologia Proposta: 1. Processamento de amostras: Obtenção de plasma e Obtenção de soro 2. Preparo do extrato proteico solúvel de Leishmania1, 3. Elisa 4. Citometria de fluxo 5. Ensaio de Imunoproliferação celular 7. Eletroforese Bidimensional: Migração em primeira dimensão – IEF e Migração em segunda dimensão - GEL SDS PAGE 8. Western Blot 9. Digestão triptica em gel de poliacrilamida 10. Identificação das proteínas Imunoreativas por MALDI – TOF

11. Será realizada pesquisa do banco de dados sobre todos os espectros encontrados. As sequências serão pesquisadas no banco de dados disponível (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) buscando pelo organismo Leishmania (taxid: 5658). 12. Será realizada análise estatística

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar do perfil imunológico (celular e humoral) de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de leishmaniose visceral (LV) antes, durante e após o tratamento. **Objetivo**

Endereço: Rua Domingos Vieira 500
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.150-240
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8033 **Fax:** (31)3238-8838 **E-mail:** cep@santacasabh.org.br



Continuação do Parecer: 1.709.503

Secundário: Avaliar a resposta imune celular por meio da produção de citocinas tais como INF, IL-4, IL-12 e IL-10, em ELISA de captura e citometria de fluxo nos Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs), de pacientes com LV antes, durante e após o tratamento medicamentoso e comparar o perfil imunológico em ambos os casos. Avaliar a resposta humoral dos pacientes com LV antes, durante e após o tratamento medicamentoso frente aos antígenos do parasito. Avaliar o perfil de Imunoproliferação dos PBMCs antes, durante e após o tratamento. Utilizar o método de Imunoproteômica para Identificação de proteína(s), preditoras de prognóstico e marcadores de cura, nas diversas etapas do tratamento. Avaliar a resposta imune celular por meio da produção de citocinas tais como INF, IL-4, IL-12 e IL-10, em ELISA de captura e citometria de fluxo nos Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs), de pacientes com LV antes, durante e após o tratamento medicamentoso e comparar o perfil imunológico em ambos os casos. Avaliar a resposta humoral dos pacientes com LV antes, durante e após o tratamento medicamentoso frente aos antígenos do parasito. Avaliar o perfil de Imunoproliferação dos PBMCs antes, durante e após o tratamento. Utilizar o método de Imunoproteômica para Identificação de proteína(s), preditoras de prognóstico e marcadores de cura, nas diversas etapas do tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O estudo não apresenta riscos ao paciente, pode ocorrer apenas desconforto devido a necessidade de coleta de sangue para realização dos testes.

Benefícios: Os benefícios dessa pesquisa estão relacionados a possibilidade de melhor tratamento da doença através dos dados encontrados na pesquisa

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo possui relevância clínica e científica, está bem fundamentado do ponto de vista teórico, os aspectos metodológicos estão bem claros e demonstram eficácia, e seguindo os preceitos da resolução 466/12 - CNS/MS/CONEP, assim como dos documentos acessórios, não existem óbices éticos para a realização do estudo.

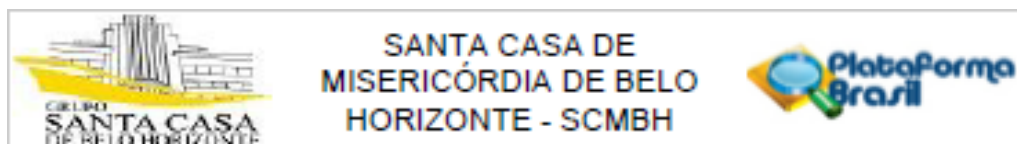
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Devidamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Endereço: Rua Domingos Vieira 590
 Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.150-240
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3238-8933 Fax: (31)3238-8838 E-mail: cep@santacasabh.org.br



Continuação do Parecer: 1.709.503

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_793919.pdf	20/09/2016 13:09:05		Aceito
Outros	Curriculo do Sistema de Curriculos Lattes_Manoel_Otavio_da_Costa_Rocha.pdf	20/09/2016 13:08:23	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	20/09/2016 13:05:05	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	20/09/2016 13:03:33	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
Outros	autorizacao.pdf	18/09/2016 12:10:26	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODEASSENTIMENTO.pdf	18/09/2016 11:52:31	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	18/09/2016 11:51:30	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 08 de Outubro de 2016

Assinado por:

Francisco das Chagas Lima e Silva
(Coordenador)