

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:**  
**INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

**NATHALIA CORAL GALVANI**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA  
PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE PARA  
O DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DAS  
LEISHMANIOSES TEGUMENTAR E VISCERAL**

**BELO HORIZONTE - MG**

**2023**

NATHALIA CORAL GALVANI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA PROTEÍNA  
QUIMÉRICA RECOMBINANTE PARA O DIAGNÓSTICO E  
PROGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTAR E  
VISCERAL**

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

Orientadores:

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho  
(UFMG)

Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de  
Ávila (UNESC)

**BELO HORIZONTE – MG**

**2023**

G182d Galvani, Nathalia Coral.  
Desenvolvimento e avaliação de uma proteína quimérica recombinante para o diagnóstico e prognóstico das leishmanioses tegumentar e visceral [recursos eletrônicos]. / Nathalia Coral Galvani. - - Belo Horizonte: 2023.  
119 f.: il  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antônio Ferraz Coelho.  
Coorientador (a): Ricardo Andrez Machado de Ávila.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmania infantum. 2. Leishmania braziliensis. 3. Doenças Negligenciadas. 4. Epitopos de Linfócito B. 5. Quimera. 6. Biologia Computacional. 7. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. II. Ávila, Ricardo Andrez Machado de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 700



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL  
**ATA DE DEFESA DE TESE**

Às **13:00** horas do dia 07 de julho de 2023, no Canal do CETES - Plataforma LIFESIZE, realizou-se a sessão pública para a 218ª defesa de tese de **NATHALIA CORAL GALVANI**, número de registro 2019715621, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO**, orientador. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. EDWARD JOSÉ DE OLIVEIRA (FIOCRUZ)**, **PROF. ALEXSANDRO SOBREIRA GALDINO (UFSJ)**, **PROFA. DENISE UTSCH GONÇALVES (UFMG)**, **DRA. VIVIAN TAMIETTI MARTINS (UFMG)**, **PROF. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA – ORIENTAÇÃO DUPLA (UNESC)**, **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"Desenvolvimento e avaliação de uma proteína quimérica recombinante para o diagnóstico e prognóstico das Leishmanioses tegumentar e visceral"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a **Tese de Doutorado**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 07 de julho de 2023.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Alexsandro Sobreira Galdino, Usuário Externo**, em 07/07/2023, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Andrez Machado de Ávila, Usuário Externo**, em 07/07/2023, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Tamietti Martins, Usuário Externo**, em 08/07/2023, às 18:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 10/07/2023, às 08:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edward José de Oliveira, Usuário Externo**, em 10/07/2023, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Denise Utsch Goncalves, Professora do Magistério Superior**, em 11/07/2023, às 09:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2428692** e o código CRC **5AC14DFD**.

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

REITORA: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dra. Isabela Almeida Pordeus

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

**FACULDADE DE MEDICINA**

DIRETORA: Prof. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

VICE-DIRETORA: Profa. Dra. Cristina Gonçalves Alvim

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dra. Ana Cristina  
Simões e Silva

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical**

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

SUBCOORDENADOR: Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Junior

**MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO**

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Profa. Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

Profa. Dra. Mariana Costa Duarte

Prof. Dr. Unai Tupinambás

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr

Camila Simões de Freitas – Representante Discente

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses, no Departamento de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Infectologia e Medicina Tropical, da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Fisiopatologia Experimental, do Departamento de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob a orientação do prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho e Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila.

#### **APOIO FINANCEIRO**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
- Medical Research Council.
- Colégio Técnico da UFMG (COLTEC/UFMG).

*Dedico este trabalho a Deus,  
por me fortalecer e não me deixar só.  
E aos meus pais que abdicaram de muito, para  
que eu chegasse até aqui, são minha base de  
amor, sustentação e perseverança.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me abençoar e cuidar da minha família, por me guiar e nunca me deixar sentir sozinha, por me amar e escutar minhas orações, por colocar pessoas especiais no meu caminho, por fazer-me acreditar ser capaz, mesmo quando minha única certeza era a minha incapacidade, por me permitir entender que os dias não ficariam mais fáceis e que eu precisaria me fortalecer e seguir em frente, que assim tudo seria possível.

Agradeço a minha família, minha grande fortaleza. Por toda paciência, amor, cuidado e confiança. Agradeço em especial aos meus pais, fonte de amor e apoio. Por abdicarem de tanto ao longo de suas vidas, para me permitirem chegar até aqui e por nunca medirem esforços, acreditando em mim e nos meus sonhos. A minha mãe Bernardete por ter sido minha primeira professora, fonte de inspiração e determinação. Ao meu pai Alaor, que sempre me fez acreditar que eu seria capaz, me incentivando a continuar.

Agradeço ao meu noivo e companheiro de vida Samuel, por todo carinho, cuidado, paciência e incentivo. Por não me deixar desistir quando essa parecia a única opção, por me mostrar equilíbrio e ser calma quando a ansiedade e a insegurança falavam mais alto. Por aceitar caminhar comigo durante esse longo trajeto que está só começando.

Agradeço a Mirian e Rahisa, pela amizade que levarei para toda a vida. Nosso companheirismo nos manteve firme e vai muito além do laboratório. Sou muito grata por todos os inúmeros momentos bons e outros não tão fáceis assim, que tive o privilégio de viver com vocês. Por cada conselho, aprendizado, auxílio, carinho e cuidado.

Agradeço aos meus amigos Emily, Eduardo e Monique pela ajuda, ensinamento, amizade, apoio e companheirismo.

Agradeço a minha amiga Indiani que a iniciação científica me presenteou. Nossa parceria e apoio foi muito além do ambiente do laboratório, mesmo de longe sempre pude contar com a sua ajuda e amizade.

Agradeço a minha professora de inglês e amiga Luana, por todos os ensinamentos, paciência e conselhos durante esses anos.

Agradeço a Suzete, uma amiga muito especial que BH me deu. Por todo cuidado, pela estadia, pelos passeios turísticos com as suas incontáveis histórias que me traziam aconchego, pelas conversas de consolo quando a saudade de casa falava mais alto, e por me apresentar a incrível comida mineira que fazia tudo parecer mais leve.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Fisiopatologia experimental – FISIOPAT da UNESC e ao grupo BIOTECH, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho e por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço a Amanda e a Dani Pagliara, vocês foram essenciais na execução deste trabalho, sou imensamente grata! Obrigada por me receberem com todo carinho no COLTEC, pela paciência, dedicação, pelos ensinamentos e imensa ajuda durante todo esse período.

Agradeço a Vivian, Dani Vale, Flávia, Fernanda e Thais por toda ajuda e carinho durante o desenvolvimento deste trabalho. E a todos os colegas e membros do laboratório que pude conhecer, tanto do COLTEC quanto do laboratório da Faculdade de Medicina, sou grata por toda ajuda que me foi dada.

Agradeço a todos os colegas e pesquisadores. Em especial a Daysiane pela sua ajuda, ensinamentos, paciência, disponibilidade, dedicação e comprometimento com o trabalho. Ao prof. Myron e ao seu grupo de pesquisa pelo apoio e infraestrutura cedidos durante parte da execução, todos vocês foram essenciais para a conclusão desta tese.

Agradeço ao meu orientador Prof. Ricardo Andrez Machado de Ávila, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa ao fim da graduação, saindo de outra linha de pesquisa e pelos quase 8 anos de orientação. Por todos os ensinamentos, paciência, dedicação e compreensão. Por toda confiança e oportunidades que me foram dadas e por me permitir evoluir profissionalmente como docente e pesquisadora.

Agradeço ao meu também orientador Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho, por todo acolhimento em me receber no seu laboratório durante o doutorado. Sou grata pelas oportunidades, auxílio, paciência, ensinamentos e colaborações ao longo destes anos de pesquisa.

Agradeço a todos os pesquisadores, mestres, doutores e professores que conheci durante toda esta caminhada, por todo exemplo e conhecimento que foi me passado.

Agradeço aos colaboradores por todo apoio financeiro e quanto a infraestrutura fornecida, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Medical Research Council, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Universidade de Southampton, ao Colégio Técnico da UFMG (COLTEC/UFMG) e a Faculdade de Medicina da UFMG.

“De todas as virtudes, a simplicidade é a minha favorita, tanto que acredito que pode resolver a maioria dos problemas, sejam pessoais, sejam mundiais. Quando a abordagem da vida é simples, não é preciso mentir tanto, nem brigar, roubar, invejar, enraivecer, agredir, matar. Todos terão o suficiente com abundância, e não precisarão acumular, especular, apostar, odiar. Quando o caráter é belo, somos belos. Essa é a beleza da simplicidade.”

*Ela Bhatt*

*(Retirado do livro Essencialismo, do autor: Greg McKeown)*

## RESUMO

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas com alta endemicidade e que afetam milhares de pessoas no mundo. Sua infecção é causada por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. A diversidade biológica entre as espécies é quem permite determinar as manifestações clínicas, sendo elas na forma de leishmaniose visceral (LV) ou leishmaniose tegumentar (LT). Dentre estas manifestações, a LV é considerada a mais grave, devido sua alta letalidade e grande emergência em indivíduos com a infecção provocada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Atualmente, as medidas de controle e prevenção adotadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), baseiam-se em uma combinação de estratégias de intervenção contra a infecção, uma vez que o diagnóstico eficaz e precoce é indispensável para que se possa intervir com o tratamento adequado, diminuindo índices de mortalidade e a evolução de complicações clínicas. Entretanto, os testes sorológicos utilizados apresentam sensibilidade e especificidade prejudicadas em pacientes com leishmanioses e/ou coinfectados LV/HIV, devido a baixos níveis de anticorpos antileishmanial ou pela presença de doenças que causem reação cruzada, levando a resultados falso-positivos. A sensibilidade torna-se também variável em pacientes tratados, uma vez que a sorologia pode manter-se positiva por meses ou anos após o fim do tratamento e cura da doença. Buscando resolver tal problemática, a identificação de novos antígenos, por meio de análises de bioinformática associadas à imunoproteômica, tem permitido a detecção de novas proteínas com potencial aplicação diagnóstica. Em estudos anteriores, as proteínas hipotéticas LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP foram encontradas em espécies de *Leishmania* spp, e avaliadas em suas versões recombinantes por meio de ensaios de ELISA, obtendo resultados satisfatórios para a detecção da LV humana e canina. Com base nessas informações, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma proteína quimera recombinante baseada na predição de epítomos lineares específicos de células B das quatro proteínas antigênicas de *L. infantum* citadas e avaliar o potencial diagnóstico, assim como dos peptídeos individuais que a constituíram, frente à leishmaniose humana, bem como com a coinfeção com HIV, além de testar os antígenos como marcadores prognóstico após o tratamento da LV e LT. As sequências de aminoácidos das proteínas foram avaliadas e oito epítomos de células B foram preditos e utilizados na construção de uma nova proteína quimérica. A proteína foi expressa, purificada e avaliada como antígeno recombinante em ELISA para o diagnóstico de LV, LT, coinfeção LV/HIV e prognóstico em amostras de pacientes tratados de LV e LT. Os epítomos de células B usados na construção da quimera foram sintetizados e também testados em ELISA frente às mesmas amostras, assim como um extrato antigênico solúvel de *Leishmania braziliensis* (SLA). Os resultados mostraram que a proteína quimera apresentou sensibilidade e especificidade de 100% para diagnosticar a LV, LT e LV/HIV, enquanto os peptídeos sintéticos apresentaram sensibilidade variando entre eles de 9,1% a 90,9% para amostras de LT e 76,8% a 99,2% para amostras de LV e LV/HIV, já os valores de especificidade atingiram 98,3% a 99,1% para LT e 67,1% a 95,7% para LV e LV/HIV. O SLA apresentou sensibilidade e especificidade de 18,2% e 98,3% para LT, e 56,8% a 69,5% para amostras de LV e LV/HIV, respectivamente. Uma avaliação prognóstica preliminar mostrou ainda que os anticorpos anti-quimera diminuíram em níveis significativos, quando comparada a reatividade sorológica antes e seis meses após o tratamento, sugerindo um possível papel prognóstico da quimera para as leishmanioses. O presente estudo, mostrou-se eficaz na construção e avaliação de novos candidatos, que demonstram ter um bom desempenho na detecção diagnóstica e prognóstica para as leishmanioses e dos casos de coinfeção LV/HIV.

**Palavras-chave:** *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, epítomos de células B, quimera, bioinformática, ELISA.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected tropical diseases with high endemicity that affect thousands of people in the world. Infection is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. The biological diversity between species is what allows determining the clinical manifestations, either in the form of visceral leishmaniasis (VL) or tegumentary leishmaniasis (TL). Among these clinical manifestations, VL is considered the most serious, due to its high lethality and great emergence in individuals with infection caused by the human immunodeficiency virus (HIV). Currently, the control and prevention measures adopted by the World Health Organization (WHO) are based on a combination of intervention strategies against the infection, since an effective and early diagnosis is essential to intervene with the appropriate treatment, decreasing mortality rates and evolution of clinical complications. However, the serological tests used show impaired sensitivity and specificity in patients with leishmaniasis and/or coinfecting with VL/HIV, due to low levels of anti-leishmanial antibodies or the presence of diseases that cause cross-reaction, leading to false-positive results. The sensitivity also becomes variable in treated patients, since the serology can remain positive for months or years after the end of the treatment and cure of the disease. Seeking to solve this problem, the identification of new antigens, through bioinformatic analysis associated with immunoproteomic, has allowed the detection of new proteins with potential diagnostic application. In previous studies, the hypothetical proteins LiHyT, LiHyD, LiHyV and LiHyP were found in species of *Leishmania* spp, and evaluated in their recombinant versions through ELISA assays, and satisfactory results were obtained for the detection of human and canine VL. Based on this information, the present work aimed to develop a recombinant chimera protein through on the prediction of specific linear epitopes of B cells derived from these four antigenic proteins of *L. infantum* and to evaluate its diagnostic potential, as well as the individual peptides that constitute it, against human leishmaniasis, as well as co-infection with HIV, in addition to testing them as possible prognostic markers of patients after VL and TL treatment. The amino acid sequences of the proteins were evaluated and eight B cell epitopes were predicted and used in the construction of a new chimeric protein. The protein was expressed, purified and evaluated as a recombinant antigen in ELISA for the diagnosis of VL, TL, VL/HIV co-infection and prognosis in samples from patients treated for VL and TL. The B cell epitopes used in the construction of the chimera were synthesized and also tested in ELISA against the same samples, as well as a soluble *Leishmania braziliensis* antigenic extract (SLA). The results showed that the chimera protein presented sensitivity and specificity of 100% for diagnosing VL, TL and VL/HIV, while the synthetic peptides showed sensitivity ranging from 9.1% to 90.9% for TL samples and 76.8 % to 99.2% for VL and VL/HIV samples, while the specificity values reached from 98.3% to 99.1% for TL and 67.1% to 95.7% for VL and VL/HIV. The SLA showed sensitivity and specificity of 18.2% and 98.3% for TL, and 56.8% to 69.5% for VL and VL/HIV samples, respectively. A preliminary prognostic evaluation also showed that anti-chimera antibodies significantly decreased when compared to serological reactivity before and six months after treatment, suggesting a possible prognostic role of the antigen for leishmaniasis. The present study proved to be effective in the construction and evaluation of new candidates, who demonstrate good performance in diagnostic and prognostic detection for leishmaniasis and VL/HIV co-infection.

**Keywords:** *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, B cell epitopes, chimera, bioinformatics, ELISA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência mundial de endemicidade da leishmaniose cutânea.....	30
Figura 2 - Número de casos de leishmaniose tegumentar nas Regiões das Américas e sub-regiões, 2001-2020.....	30
Figura 3 - Incidência mundial de endemicidade da leishmaniose visceral.....	31
Figura 4 - Número de casos de leishmaniose visceral nas Regiões das Américas, 2001-2020. ....	31
Figura 5 – Distribuição mundial da leishmaniose e países que relatam coinfeção <i>Leishmania</i> /HIV.....	32
Figura 6 - Proporção de coinfeção LV/HIV e número de casos de leishmaniose visceral nas Regiões das Américas, 2012-2020.....	33
Figura 7 – Ciclo biológico do parasito do gênero <i>Leishmania</i> spp. ....	35
Figura 8 – Alinhamento e avaliação de similaridade entre as sequencias das proteínas. (A) LiHyT (XP_001465138.1) e (B) LiHyD (XP_001468360.1).....	120
Figura 9 – Alinhamento e avaliação de similaridade entre as sequencias das proteínas (C) LiHyV (XP_001462854.1) e (D) LiHypNOVA1 (XP_001468385.2). ....	121
Figura 10 - Sequência linear da proteína quimera.....	122
Figura 11 – Confirmação dos epítomos com provável resposta celular do tipo B.....	122
Figura 12 – Características físico e químicas da proteína quimera. ....	123
Figura 13 - Gel SDS-PAGE da proteína quimérica.....	123
Figura 14 - Soros humanos utilizados no estudo.....	124

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida humana
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AUC	Área sobre a curva
BSA	Albumina bovina sérica
CD40	Cluster de diferenciação 40
CDs	Células dendríticas
DAT	Teste de aglutinação direta
DMF	Dimetilformamida
DMFDCM	Diclorometano
DO	Densidade ótica
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
Es	Especificidade
Fmoc	Fluorenil-metiloxicarbonila
FT	<i>Flow Through</i>
g	Gramma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC	Intervalo de confiança
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-23	Interleucina-23
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosideo
IgG	Imunoglobulina G
JAK/STAT	Via Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da via de transcrição

kDa	Kilodalton
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
Ma	Mili-ampere
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NK	Células Natural Killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PBS-T	Solução salina de tampão fosfato com Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rK39	Proteína recombinante cinesina de 39 kDa
ROC	Característica de operação do receptor, do inglês <i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RRP	Receptores de reconhecimento padrão
RRP	Reconhecimento padrão
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RV	Razão de verossimilhança
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante
Se	Sensibilidade
SFB	Soro fetal bovino inativado
SLA	Extrato proteico antigênico solúvel de <i>Leishmania</i>
T CD4+	Linfócito T com <i>cluster</i> de diferenciação 4
T CD8+	Linfócito T com <i>cluster</i> de diferenciação 8
TARV	Terapia antirretroviral



TES	Trietilsilano
TFA	Ácido trifluoracético
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
Th	Linfócitos T auxiliar
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
Y	Índice Youden
$\mu\text{g}$	Micrograma

## LISTA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviaturas	
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	<b>21</b>
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA HISTÓRIA ACADÊMICA .....	21
1.2 CONSTRUÇÃO DO PROJETO .....	22
<b>2 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>29</b>
3.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES E COINFECÇÃO LV/HIV .....	29
3.2 ETIOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO <i>Leishmania</i> spp.....	34
3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES .....	36
<b>3.3.1 Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar (LT)</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3.2 Manifestações clínicas da leishmaniose visceral (LV)</b> .....	<b>37</b>
3.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES.....	38
3.5 COINFECÇÃO LV COM HIV: ASPECTOS GERAIS .....	41
3.6 MEDIDAS DE CONTROLE E PROFILAXIA NAS LEISHMANIOSES .....	43
3.7 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES E COINFECÇÃO LV/HIV .....	44
3.8 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES: ASPECTOS GERAIS .....	47
<b>3.8.1 Exame parasitológico</b> .....	<b>48</b>
<b>3.8.2 Exame molecular</b> .....	<b>49</b>
<b>3.8.3 Diagnóstico imunológico</b> .....	<b>50</b>
3.9 PROTEÍNAS ALVO UTILIZADAS NESTE ESTUDO .....	52
3.10 BIOINFORMÁTICA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MARCADORES DIAGNÓSTICOS.....	54
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>57</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	57
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	57
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>58</b>
5.1 APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG .....	58
5.2 PARASITOS .....	58
5.3 PREPARO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE <i>L. infantum</i> E <i>L. braziliensis</i> .....	58
5.4 AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS UTILIZADOS PARA ESTUDO DE LV E COINFECÇÃO LV/HIV .....	59

5.5 AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DOS ANTÍGENOS FRENTE LT .....	59
5.6 AMOSTRAS DE PACIENTES APÓS TRATAMENTO.....	60
5.7 SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	60
5.8 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS ESPECÍFICOS DE CÉLULAS B .....	61
5.9 CONSTRUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E SÍNTESE DA PROTEÍNA QUIMÉRICA .	62
5.10 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA .....	62
5.11 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	63
5.12 IMMUNOBLOTTING .....	64
5.13 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS .....	65
5.14 ELISA UTILIZANDO OS ANTÍGENOS .....	65
5.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	66
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
6.1 ARTIGO 1 – BREVE INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	67
6.2 ARTIGO 1 – CONCLUSÃO.....	79
6.3 ARTIGO 2 – BREVE INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	80
6.4 ARTIGO 2 – CONCLUSÃO.....	90
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO DA TESE .....</b>	<b>91</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>92</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
<b>10 ANEXOS .....</b>	<b>107</b>
10.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO JUNTO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (COEP) DA UFMG.....	107
<b>11 APÊNDICES .....</b>	<b>108</b>
11.1 PATENTES DEPOSITADAS DURANTE O DOUTORADO .....	108
11.2 DEMAIS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO .....	112
11.3 DADOS SUPLEMENTARES.....	120
<b>11.3.1 Alinhamento e avaliação de similaridade entre as sequências das proteínas .....</b>	<b>120</b>
<b>11.3.2 Sequência linear da proteína quimera.....</b>	<b>122</b>
<b>11.3.3 Confirmação dos epítopos com provável resposta celular do tipo B .....</b>	<b>122</b>
<b>11.3.4 Características físico e químico da proteína quimera.....</b>	<b>123</b>
<b>11.3.5 Gel SDS-PAGE da proteína quimérica. ....</b>	<b>123</b>
<b>11.3.6 Soros humanos utilizados no estudo.....</b>	<b>124</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA HISTÓRIA ACADÊMICA

Graduada em Ciências Biológicas (Bacharelado), pela Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, iniciei minha carreira acadêmica na pesquisa já no primeiro ano de graduação em 2013 onde ingressei como aluna de Iniciação Científica no grupo de pesquisa em Genética Toxicológica, coordenado pela prof. Dra. Vanessa Moraes de Andrade. Neste grupo permaneci durante os quatro anos de graduação, onde participei de inúmeros projetos voltados a Biologia Molecular, por meio de análises de genotoxicidade e mutagênese. Durante a graduação, também pude adquirir experiência nas áreas de microbiologia e ecotoxicologia, através de estágios voluntários na instituição. Ao longo dos anos de iniciação científica busquei aprender ao máximo sobre todas as linhas de pesquisa do laboratório, foi dessa forma que conheci as linhas de estudo do Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, o qual passei a me interessar e pesquisar mais sobre a área de animais peçonhentos e a toxinologia, que fazem parte da expertise do professor. Foi então que o Prof. Ricardo passou a me coorientar junto com a orientação da Prof. Dra. Vanessa durante o trabalho de conclusão de curso, intitulado “Danos ao DNA de camundongos inoculados com veneno de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922”. Em 2017 conclui a graduação e no mesmo ano ingressei no mestrado através do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC, no qual fui orientada também pelo Prof. Dr. Ricardo e coorientada pela Prof. Dra. Vanessa.

No decorrer do mestrado percebi me enquadrar melhor nas linhas de pesquisa coordenadas pelo Prof. Ricardo, o qual possui expertise nas áreas de bioinformática e biotecnologia peptídica aplicada ao desenvolvimento de novos produtos biológicos como testes diagnósticos, vacinas e caracterização de toxinas de animais peçonhentos. Fui bolsista durante todo o período de mestrado no laboratório de Fisiopatologia Experimental, no grupo de pesquisa em Biotecnologia peptídica aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos.

Durante os dois anos de mestrado, trabalhamos inúmeras vezes em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, que me possibilitou ter engajamento em diversos projetos voltados ao desenvolvimento de novos testes diagnósticos e vacinas para controle de doenças infecciosas e tropicais. A realização de tais projetos se deu por meio da predição de epítomos através de ferramentas de bioinformática, resultando em múltiplos artigos científicos publicados em revistas de alta relevância científica.

Foi durante o mestrado que conheci as linhas de pesquisa do grupo de Tecnologias Inovadoras para o Controle das Doenças Infecciosas e Tropicais, coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho e devido às colaborações entre os professores, foi possível aprender e me aperfeiçoar sobre a aplicação de ferramentas de bioinformática e sua importância no desenvolvimento de produtos biológicos, principalmente voltadas para as Leishmanioses. Foi então que por meio de processo seletivo, ingressei no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG sobre dupla orientação do Prof. Dr. Eduardo e Prof. Dr. Ricardo. Durante todo esse período acadêmico até o presente momento, além das inúmeras experiências resumidamente descritas acima, cursei uma segunda graduação de Licenciatura em Ciências Biológicas, realizei coorientações, orientações, participação em bancas, obtive inúmeras experiências como docente, ministrei palestras na graduação e pós-graduação, participação em eventos, além de artigos científicos publicados, depósito de três patentes e um produto biológico, sendo duas das patentes resultantes desta tese.

## 1.2 CONSTRUÇÃO DO PROJETO

A presente tese de doutorado teve como principal objetivo predizer epítomos lineares específicos de células B encontrados em sequências de proteínas hipotéticas identificadas anteriormente em estudo imunoproteômico em parasitos de *L. infantum*, publicado sob a orientação do prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, o qual possui uma vasta expertise nas linhas de desenvolvimento de testes diagnósticos, marcadores terapêuticos e vacinas para as leishmanioses.

Tendo em vista a vasta experiência dos orientadores nas linhas de pesquisas que norteiam esta tese, um dos importantes fatores de tal estudo foi a necessidade emergencial do desenvolvimento de novos kits diagnósticos para as leishmanioses. As leishmanioses são doenças negligenciadas mundialmente e consideradas um importante problema de Saúde Pública. Apresentam elevadas estimativas globais da ocorrência de novos casos anualmente, sendo o Brasil um dos países com maiores índices de notificação. Outro problema enfrentado na detecção dessas doenças está nos indivíduos coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), uma vez que ocorrem em países onde ambas as doenças são endêmicas.

Tendo conhecimento das inúmeras limitações que rodeiam o controle das leishmanioses no quesito diagnóstico, foco deste trabalho, tal tese teve por objetivo, predizer epítomos de células B específicos, encontrados em quatro proteínas hipotéticas LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP, selecionadas por meio de ferramentas de bioinformática, afim de construir, a partir destes

peptídeos, uma proteína quimérica a ser utilizada como um possível marcador diagnóstico das leishmanioses e de coinfeção LV/HIV, além da aplicação prognóstica em amostras de pacientes tratados de leishmaniose.

A apresentação deste trabalho foi elaborada de acordo com a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013; o qual regulamenta o formato dos trabalhos finais de defesa de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG. O presente estudo está inserido na linha de pesquisa de “Leishmanioses”.

## 2 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias no qual a infecção é causada por parasitos protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (GRIMALDI; TESH, 1993; PAHO, 2020). A infecção em mamíferos pode ocorrer por transmissão de mais de 20 diferentes espécies de *Leishmania*, atualmente já descritas (ROSSI; FASEL, 2018). A diversidade biológica do protozoário, possibilita o surgimento de distintas manifestações clínicas da doença, que estão em sua maioria associadas ao estado imunológico do hospedeiro e à espécie do vetor infectante (ROSSI; FASEL, 2018). Dentre as diferentes manifestações das leishmanioses, encontram-se: a leishmaniose tegumentar (LT), que abrange as formas cutânea (LC) ou mucosa (LM) da doença e a leishmaniose visceral (LV). No Brasil, a LT pode ser causada principalmente pelas espécies de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*, enquanto a LV é causada pela espécie *Leishmania infantum*. Dentre as formas da doença, a LV é considerada a mais grave, devido à sua alta letalidade, alcançando 95% dos casos quando aguda e não tratada (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Independente das formas clínicas manifestadas, essas são doenças que apresentam ampla distribuição geográfica em todo o mundo, com grande número de registros em países de toda a América Latina (PAHO, 2020). Dados demonstram que cerca de 68 mil novos casos de LV foram notificados entre os anos de 2001 à 2020, distribuindo-se em torno de 13 países nas Américas, e mais de 39,7 mil casos de LC e LM foram registrados em 2020 na América Latina (PAHO, 2022a). Mesmo frente a inúmeras notificações, as leishmanioses enquadram-se entre as principais doenças tropicais negligenciadas (DTNs) do mundo, sendo que esses dados são baseados nos recursos aplicados de forma limitada em diagnóstico, tratamento e vigilância (MOHAN et al., 2022).

As DTNs constituem um grupo com 20 doenças, associadas a países de baixa e média renda, localizados em regiões onde saneamento básico, acesso a água potável e alguns cuidados de saúde são precários e negligenciados (MOHAN et al., 2022; WHO, 2021). Uma vez que essas doenças são responsáveis por gerar sintomas graves e frequentemente evoluem a morte, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu um roteiro para redução e possível controle. Tal proposta obteve progresso, porém muitas das metas estabelecidas para 2020 não foram alcançadas (ASSIS; RABELLO; COTA, 2021). O roteiro atual de 2021-2030, estabelece metas globais com intuito de prevenir, controlar, eliminar ou erradicar essas doenças, no qual se fundamenta sobre três pilares: (1) acelerar a ação programática, (2) intensificar as abordagens transversais e (3) mudar os modelos operacionais e a cultura para facilitar a apropriação do país.



Para a execução do primeiro pilar, o diagnóstico é citado como um dos mais importantes fatores para o desenvolvimento de tal estratégia (WHO, 2020).

Atualmente, as leishmanioses são doenças proeminentes e de grande preocupação de saúde pública em quase 100 países no mundo (GOYAL; KESHAV; KAUR, 2021; CAVALCANTE et al., 2021). Dentre os países com maior número de casos, encontra-se o Brasil, com 15.484 registros no ano de 2020 (PAHO, 2020). Globalmente, estima-se que ocorram cerca de 600 mil a 1 milhão de novos casos de LT e de 50 mil a 90 mil casos de LV por ano sendo que, destes, apenas 25 a 45% são relatados à OMS (WHO, 2021).

Além da elevada incidência e mortalidade da LV, a doença é também considerada emergente em indivíduos com a infecção provocada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BRASIL, 2015). A associação com outras doenças e infecções, é um fator importante que dificulta o controle das leishmanioses em diversas regiões do mundo (BURKI; ZWIZWAI, 2022). A infecção por HIV é responsável pelo desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência - AIDS, um problema de saúde pública mundial, uma vez que cerca de 39 milhões de pessoas encontram-se infectadas (WHO, 2022e). Com base em taxas de crescimento e registros mundiais, mais de 42 milhões de pessoas viverão com HIV até o ano de 2030 (DYBUL et al., 2021; IHME, 2023). Estima-se ainda, que um terço das pessoas que vivem com HIV, encontram-se em locais endêmicos de LV (BURKI; ZWIZWAI, 2022).

Pacientes coinfectados com LV/HIV apresentam maior letalidade devido à imunossupressão desenvolvida, podendo influenciar diretamente em complicações clínicas, dificuldade no tratamento e ineficiência do diagnóstico (LINDOSO et al., 2018). Sua progressão caminha de acordo com a resposta imunológica do indivíduo, podendo ocorrer de forma acelerada (LINDOSO et al., 2018). A imunossupressão induzida pela coinfeção pode levar à maior replicação viral, evoluindo para a AIDS (LIMA et al., 2017). Em consequência, podem ocorrer complicações em casos de indivíduos com LV assintomática, de forma que a coinfeção acaba por estimular o agravamento e a manifestação de ambas as doenças devido à depleção do sistema imune (BRASIL, 2015).

As células T efectoras desempenham um importante papel no controle de infecções desenvolvidas por patógenos intracelulares (FILIPPE-SANTOS et al., 2009). Na presença do HIV, ocorre a depleção do sistema imunológico pela queda na contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Essas células são as principais responsáveis pelo controle do parasito *Leishmania*, e dessa forma, acaba por ocorrer a piora do quadro de LV (LINDOSO et al., 2018). Nesse contexto, medidas de controle e prevenção são necessárias para as leishmanioses, levando em conta que, até o

momento, não existe nenhuma vacina humana disponível para o combate das doenças (JAIN; JAIN, 2015).

Atualmente as medidas profiláticas e de controle contra as leishmanioses, baseiam-se em uma combinação de estratégias de intervenção contra a infecção. As principais medidas, fundamentam-se no controle dos reservatórios (principalmente os cães) e vetores, por meio da interrupção do ciclo biológico do parasito (TESH RB, 1995; WHO, 2022d). Como métodos mais utilizados, encontram-se, a pulverização de inseticidas, uso de telas de proteção nas residências, proteção individual através do uso de repelentes, abordagens frequentes de conscientização a saúde pública, vigilância efetiva em locais de maior endemicidade, além de diagnóstico e tratamento precoce nos indivíduos infectados (GRIMALDI; TESH, 1993; TESH RB, 1995; WHO, 2022d). Uma outra medida também adotada é a eutanásia de cães soropositivos, estes que são considerados os principais reservatórios domésticos dos parasitos, entretanto são animais de estimação e grande apreço, além de tal medida não influenciar significativamente na redução do número de novos casos e ser eticamente questionável (TESH RB, 1995). A eliminação de animais silvestres considerados reservatórios, é também contestável, visto a capacidade de adaptação do parasito a outros reservatórios (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; TESH RB, 1995). Sobretudo, nenhuma das medidas existentes tem demonstrado ser suficientemente eficaz.

Embasado nessa realidade, protocolos de diagnóstico por meio de ferramentas sensíveis e específicas, assim como outros aspectos de controle, devem ser considerados, principalmente em países com endemismo da doença (TAVARES, 2003). Dentre os métodos diagnósticos preconizados mundialmente, encontram-se o exame parasitológico considerado padrão ouro, e os testes sorológicos principalmente para LV, além da avaliação completa na busca de uma combinação dos sinais clínicos em que o paciente se encontra (TAVARES, 2003). Na LT, os testes sorológicos e exames parasitológicos possuem ainda maior dificuldade para detecção, devido à escassez de parasitos nas amostras coletadas, principalmente em pacientes com lesões antigas, a sensibilidade se torna variável e entre 20% à 40% dos pacientes apresentam resultados falso-negativos (MELLO, 2015; GOTO; LINDOSO, 2014; MARTINS et al., 2014; VILELA DE SOUZA et al., 2019). Os exames parasitológicos, quando realizados para LV, ocorrem através de microscopia ótica, que consiste na busca por formas amastigotas em amostras de aspirados do baço, medula óssea e linfonodos, entretanto, a escassez de parasitos presentes na amostra é também frequente (WHO, 2022d).

Dentre os testes sorológicos encontram-se os de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), teste de aglutinação direta (DAT) e testes

imunocromatográficos, além de técnicas moleculares também aplicadas, como a detecção de kDNA de *Leishmania* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (MACHADO et al., 2020a; TRAVI et al., 2018). Sobretudo, os testes atualmente disponíveis apresentam grande dificuldade quanto a aplicabilidade, visto que a coleta de amostras é considerada invasiva em alguns testes e há variações quanto a sua sensibilidade e/ou especificidade (MACHADO et al., 2020a; SAKKAS; GARTZONIKA; LEVIDIOTOU, 2016; TRAVI et al., 2018).

A grande maioria dos testes sorodiagnósticos comerciais utilizam proteínas recombinantes, como é o exemplo das proteínas rk39, rK26 e rkE16 (SARKARI; REZAEI; MOHEBALI, 2018). Essas proteínas são relacionadas à superfamília de proteínas cinesina, encontradas nas várias espécies de *Leishmania* e desenvolvem uma importante função voltada ao processo mitótico e comprimento do flagelo (BLAINEAU et al., 2007). Dentre os antígenos disponíveis, a rK39 incorporada em fitas imunocromatográficas, permitiu detectar LV com elevados níveis de sensibilidade (93 a 100%) e especificidade (97 a 98%) em pacientes, demonstrando um bom desempenho diagnóstico (DHOM-LEMOS et al., 2019; ZIJLSTRA et al., 2001).

Entretanto, existem ainda dificuldades relacionadas à eficácia dos testes de sorodiagnóstico das leishmanioses, visto a ocorrência de reatividade cruzada em indivíduos infectados com outras doenças relacionadas a LV, como é o caso de Doença de Chagas, malária e tuberculose; que provocam a obtenção de resultados falsos-positivos (COURA-VITAL et al., 2013; MACHADO et al., 2020a). A sensibilidade também é variável, principalmente em pacientes tratados, uma vez que alguns deles podem manter a sorologia positiva por meses ou anos após o fim do tratamento e cura clínica (PORTELA et al., 2018; SAVOIA, 2015; TRAVI et al., 2018).

Em casos de pacientes recém-infectados ou ainda assintomáticos, a detecção torna-se ainda mais dificultada, devido aos baixos índices de sorologia antileishmanial. O mesmo ocorre em indivíduos coinfectados com LV/HIV, podendo haver menor produção de anticorpos contra proteínas de *Leishmania*, reduzindo a sensibilidade aos testes (RAMOS et al., 2021). Ademais, resultados inconclusivos ou falsos-positivos em indivíduos residentes em áreas endêmicas da doença são também relatados (PORTELA et al., 2018; SALLES et al., 2017).

Nesse cenário, como novas alternativas focadas na busca em solucionar os problemas relacionados à baixa sensibilidade e/ou especificidade dos testes sorodiagnósticos, a identificação de novos antígenos com melhor performance torna-se uma prioridade, visando assim desenvolver novos testes de detecção para as diferentes leishmanioses humanas e coinfeção com HIV. Uma das estratégias é a busca por novos antígenos compostos por epítopos específicos de

células B e/ou através da construção de proteínas quiméricas com grande potencial diagnóstico. A implementação destes antígenos pode aumentar o desempenho de novos sorodiagnósticos, possibilitando o desenvolvimento de testes com baixo custo, maior praticidade e aplicabilidade, além de maiores índices de sensibilidade e especificidade, quando comparados aos métodos convencionais atualmente disponíveis (FERNÁNDEZ-ROBLEDO; VASTA, 2010). O princípio destas novas moléculas, chamadas de proteínas quimeras, consiste na união de diferentes fragmentos peptídicos originando uma nova proteína sintética (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2013; FERNÁNDEZ-ROBLEDO; VASTA, 2010). De modo geral, os epítomos presentes na proteína quimérica possuem a mesma natureza solúvel, mantendo-se acessíveis frente às células imunes dos hospedeiros, além de apresentarem boa estabilidade (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2013; LAGE et al., 2016a).

Buscando identificar novos antígenos, análises de bioinformática associadas à imunoproteômica para identificação de proteínas de *L. infantum* tem permitido a detecção de proteínas com potencial aplicação em testes diagnósticos (COELHO et al., 2012). Dentre as proteínas hipotéticas específicas encontradas em espécies de *Leishmania spp*; LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP foram avaliadas em suas versões recombinantes por meio de ensaios de ELISA e resultados satisfatórios foram obtidos para a detecção da LV humana e canina (LAGE et al., 2016a; MARTINS et al., 2015; PORTELA et al., 2018).

Nesse contexto, tendo em vista que a aplicação eficaz de testes diagnósticos voltados para a detecção das leishmanioses e coinfeção LV/HIV são de fato um grande desafio, e considerando as limitações existentes diante de suas aplicações, a construção de novos marcadores e proteínas quimeras como antígenos para implementação de novos testes sorodiagnósticos, poderia melhorar as condições de controle das diferentes formas de leishmanioses e coinfeção LV/HIV. Dessa forma, no presente trabalho, sequências de aminoácidos de proteínas antigênicas sendo elas LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP, selecionadas do parasito *L. infantum* foram avaliadas para a predição de epítomos de células B, e uma nova proteína quimérica foi construída a partir desses novos antígenos. A mesma, em versão recombinante, bem como os epítomos que deram origem a ela, sob a forma de peptídeos, foram testados como ferramentas diagnósticas por meio de ELISA, para detecção de LV, LT e coinfeção de LV/HIV humana, bem como sua ação prognóstica na avaliação e controle da distinção sorológica de pacientes com a doença ainda ativa, daqueles indivíduos já tratados e curados da infecção.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Epidemiologia das leishmanioses e coinfeção *Leishmania*/HIV

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias desenvolvidas pela infecção de protozoários do gênero *Leishmania* (OPAS, 2022). Mundialmente, em torno de 20 diferentes espécies de *Leishmania* já foram identificadas em infecções humanas e mais de 90 espécies de vetores flebotomíneos são conhecidos por transmitirem estes parasitos, sendo importante destacar que cerca de 54 espécies não consideradas vetoriais, podem também estar potencialmente envolvidas no processo de transmissão (PAHO, 2022d). A variedade de espécies tanto do vetor quanto do parasito, permite que as infecções apresentem um amplo espectro de manifestações clínicas, comprometendo desde a pele, até mucosas e órgãos viscerais (PAHO, 2020).

Globalmente, as leishmanioses destacam-se dentre as principais DTNs, sendo consideradas endêmicas em 98 países tropicais e subtropicais do mundo (OPAS, 2022). Atualmente, cerca de 350 milhões de pessoas encontram-se expostas aos riscos de infecção e 12 milhões de pessoas infectadas. Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas residam em áreas endêmicas, sendo que 0,9 a 1,6 milhões de novos casos de leishmanioses ocorrem ao ano, apresentando altas taxas de letalidade, com números entre 20 à 30 mil mortes notificadas (PAHO, 2023). Apesar da elevada incidência registrada, apenas 25% a 45% do total de casos estimados são de fato notificados à OMS.

Dentre as manifestações, a LT apresenta uma distribuição mundial, e estima-se que anualmente ocorram cerca de 1,5 milhões de novos casos (PAHO, 2022c). Dentre os países com maior número de notificações no ano de 2020, destaca-se o Brasil com 16.432 de casos, a Colômbia com 6.161, o Peru com 4.178, a Nicarágua com 3.443 e Bolívia com cerca de 2.059 casos (Figura 1 e 2) (OPAS, 2021; WHO, 2022a).

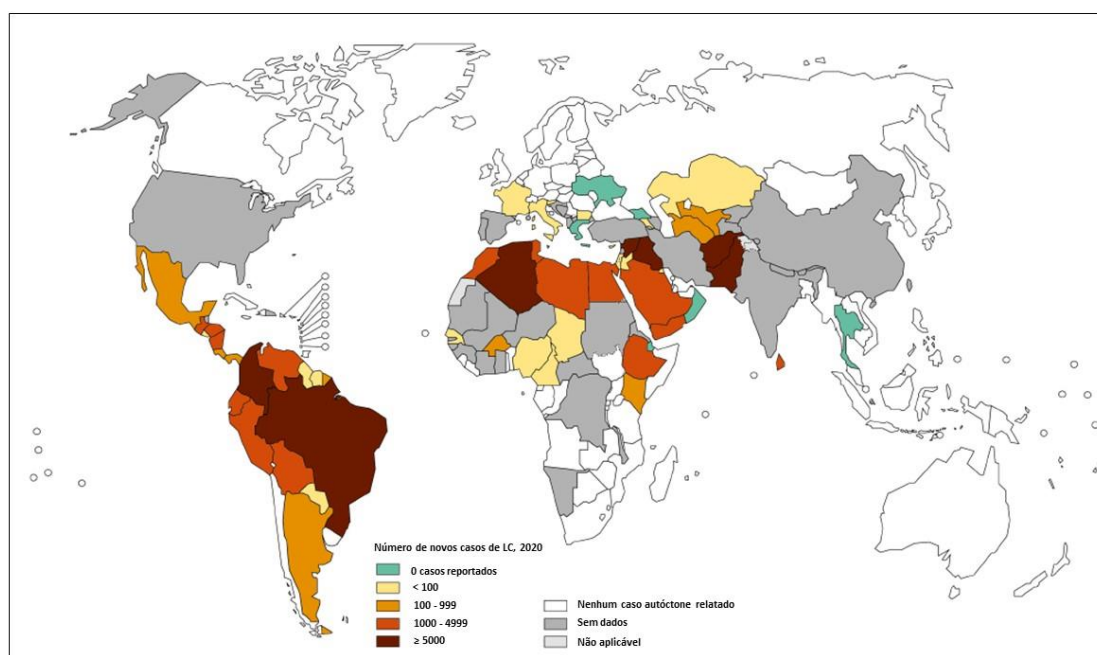


Figura 1 - Incidência mundial de endemidade da leishmaniose cutânea. Adaptado de WHO, (2022a).

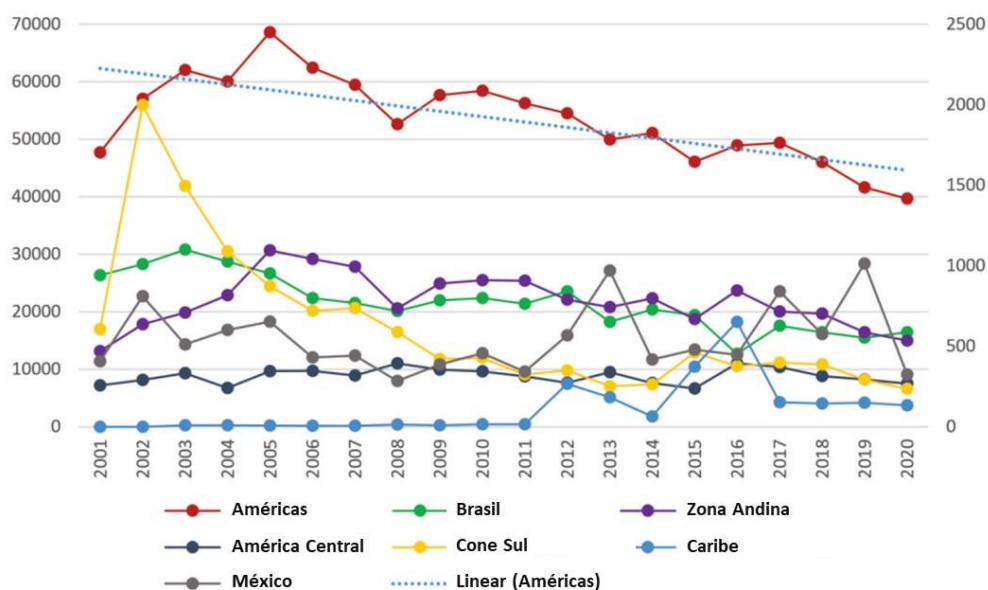


Figura 2 - Número de casos de leishmaniose tegumentar nas Regiões das Américas e sub-regiões, 2001-2020. Adaptado de OPAS, (2021).

Das diferentes formas da doença a LV é considerada a mais grave devido à sua alta letalidade, alcançando 95% dos casos quando aguda e não tratada (TORRES-GUERRERO et al., 2017; WHO, 2022d). Anualmente, estima-se que em média 3.500 casos de LV sejam notificados (Figura 3 e 4), apresentando uma taxa média em torno de 7% de letalidade (PAHO, 2022d; OPAS, 2021). Referente as áreas de maior endemidade e com casos notificados de

LV, encontram-se a Índia, Sudão, Sudão do Sul, Brasil, Etiópia e Somália (Figura 3), enquanto a LT apresenta elevados números de notificação no Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (Figura 1 e 2) (OPAS, 2021; WHO, 2022b).

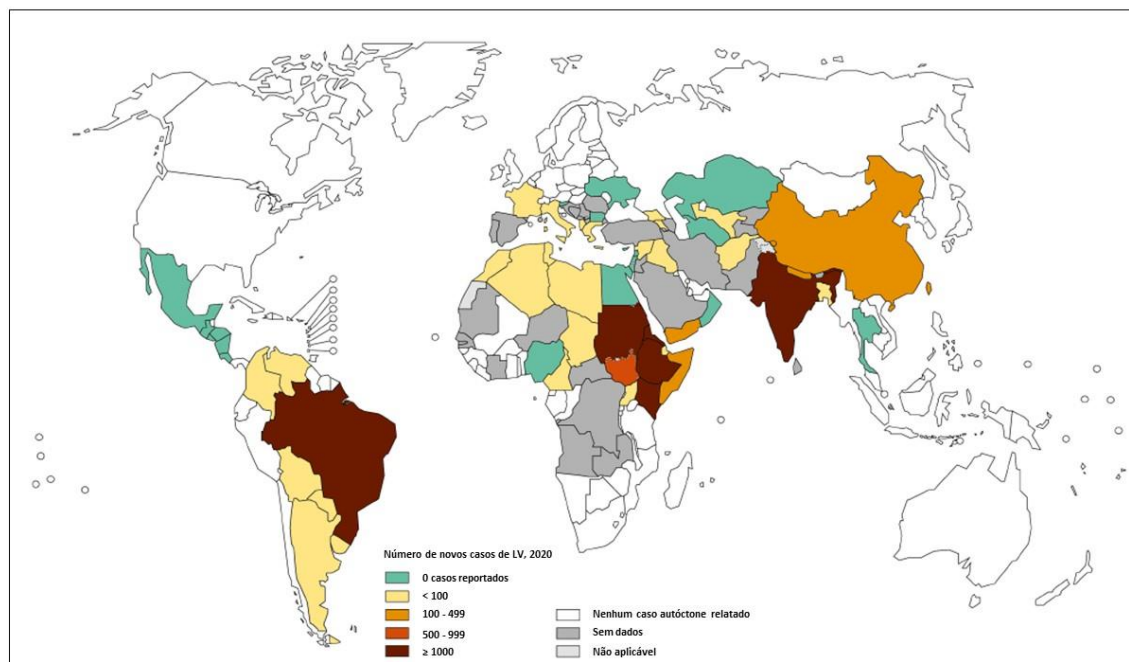


Figura 3 - Incidência mundial de endemidade da leishmaniose visceral. Adaptado de WHO, (2022b).

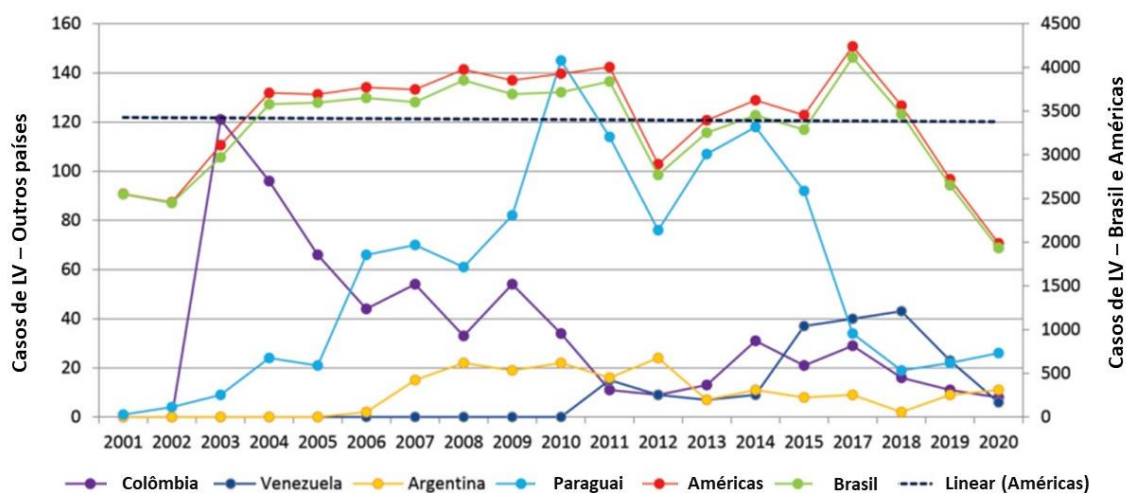


Figura 4 - Número de casos de leishmaniose visceral nas Regiões das Américas, 2001-2020. Adaptado de OPAS, (2021).

A LV é considerada a infecção com maior potencial oportunista, principalmente em pacientes infectados com HIV/AIDS (RAMOS et al., 2021). O aumento de registros de ambas as infecções isoladamente, está correlacionada a alta sobreposição geográfica tanto da infecção pelo vírus do HIV, quanto pela infecção proporcionada pelos protozoários do gênero *Leishmania* (Figura 6). A elevada incidência de casos de coinfeção, está ainda diretamente relacionada, com a piora dos sintomas e aumento nos índices de letalidade em pacientes coinfectados, tornando-se um problema emergente de saúde pública em todo o mundo (GRAEPP-FONTOURA et al., 2022).

O perfil epidemiológico de coinfeção *Leishmania*/HIV tem sofrido modificações nos últimos anos, evoluindo tanto em países desenvolvidos, quanto em países subdesenvolvidos, com relatos na Espanha, França e Itália, além de inúmeros registros no Brasil, Índia, Etiópia e outros países do continente africano. Atualmente, totalizam-se em média 35 países com notificações de coinfeção por *Leishmania*/HIV (Figura 5) (DIRO et al., 2015; GRAEPP-FONTOURA et al., 2022).

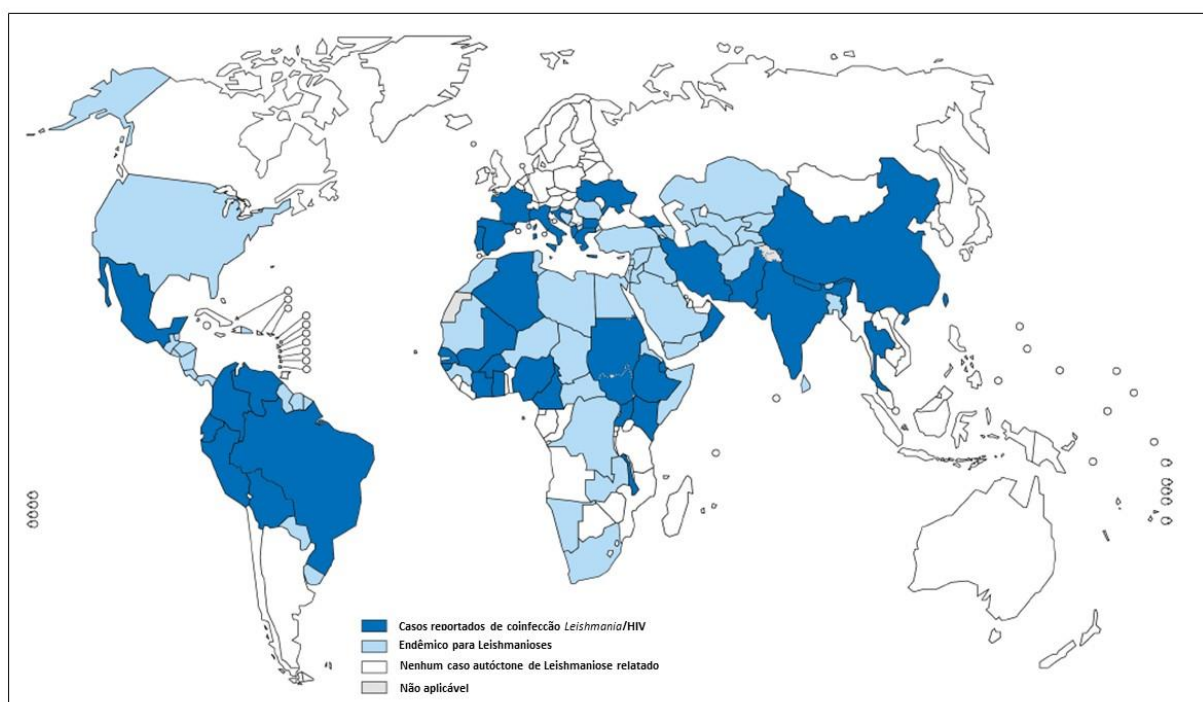


Figura 5 – Distribuição mundial da leishmaniose e países que relatam coinfeção *Leishmania*/HIV. Adaptado de WHO, (2022c).

No ano de 2018, dentre os 3.562 novos casos de LV reportados, 7% foram de coinfeção *Leishmania*/HIV (PAHO, 2018). Desde o ano de 2012, existe uma tendência crescente de coinfeção por LV e HIV nas Américas, sendo a maior proporção correspondente ao ano de 2020 com um aumento de 12,4%, quando comparado aos anos anteriores, com um total de 247 casos



ao ano (OPAS, 2021). Destes valores levantados, 98% são de notificações no Brasil (Figura 6) (OPAS, 2021).

A disseminação de ambas as infecções, como por exemplo o HIV em áreas rurais e a disseminação concomitante das leishmanioses em áreas suburbanas e urbanas, auxiliaram a expansão de ocorrência de coinfeção *Leishmania*/HIV em muitas partes do mundo (Figura 6) (GRAEPP-FONTOURA et al., 2022; OKWOR; UZONNA, 2013).

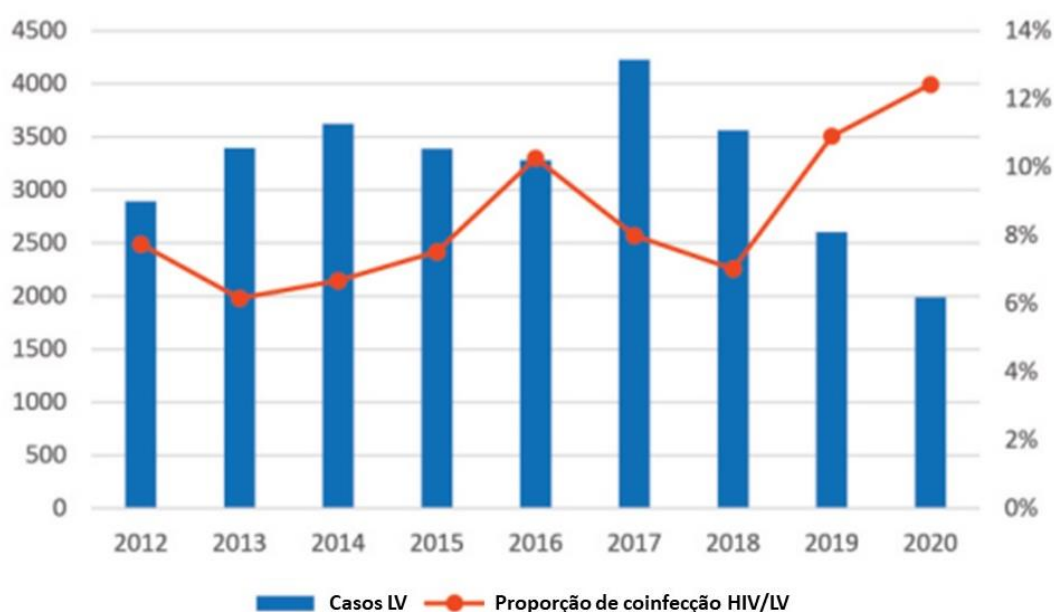


Figura 6 - Proporção de coinfeção LV/HIV e número de casos de leishmaniose visceral nas Regiões das Américas, 2012-2020. Adaptado de OPAS, (2021).

Nas últimas décadas, alguns múltiplos fatores têm sido determinantes no aumento da incidência das leishmanioses e coinfeções com outras doenças infecciosas. Uma sequência de eventos permite influenciar a disseminação de espécies vetoriais e parasitos, desde a expansão de habitat dos vetores devido a degradação ambiental, variações climáticas, migração de pessoas e cães domésticos infectados (considerados principais reservatórios) para áreas de maior transmissão e presença de vetores transmissores, além de outros aspectos como condições sanitárias precárias e outras questões socioeconômicas (ÁVILA et al., 2023; PALATNIK-DE-SOUSA, 2012).

Nos últimos anos até em média o ano de 2020, os índices de letalidade relacionados às leishmanioses cresceram gradativamente. Entretanto, muitos dos dados relatados e notificados referentes a essas infecções, sofreram uma redução em seus números a partir do ano de 2020 em muitos países, o que indica uma elevada interrupção nas atividades de vigilância devido á

pandemia da COVID-19 (OPAS, 2022). Esses dados sustentam o fato de as leishmanioses serem doenças de elevada preocupação para saúde pública a nível global, demonstrando a urgente necessidade na busca por medidas de controle mais efetivas (ALVAR et al., 2012; OPAS, 2022).

### 3.2 Etiologia e ciclo biológico do parasito *Leishmania* spp.

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias onde a infecção é causada por parasitos protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (GRIMALDI; TESH, 1993; PAHO, 2020). O parasito *Leishmania* é transmitido ao hospedeiro vertebrado em sua forma promastigota metacíclica, e inoculado no momento do repasto sanguíneo por vetores transmissores infectados, chamados de flebotomíneos (GRIMALDI; TESH, 1993). Estes vetores são, artrópodes hematófagos da ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae pertencente aos gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo e *Lutzomyia*, nas Américas (GRIMALDI; TESH, 1993; NEVES, 2016). Existem, em todo o mundo, em torno de 1000 espécies e subespécies de flebotomíneos descritas, destas apenas 10% são consideradas vetores invertebrados dos parasitos *Leishmania* (CECÍLIO; CORDEIRO-DASILVA; OLIVEIRA, 2022).

Durante o ciclo biológico do parasito as espécies podem diferenciar-se em duas principais formas morfológicas, sendo elas: amastigotas intracelulares, no hospedeiro mamífero e promastigotas, no vetor flebotomíneo (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). As formas promastigotas são flageladas e extracelulares, o que lhes confere maior motilidade; possuem estruturas denominadas de cinetoplastos, que se localizam entre a porção anterior e o núcleo, sendo encontradas no trato gastrointestinal de vetores flebotomíneos fêmeas e transmitidas ao hospedeiro mamífero, consideradas a forma infecciosa do parasito (FREITAS MESQUITA; DOS SANTOS; MEYER FERNANDES, 2021; HANDMAN; BULLEN, 2002). Já as amastigotas apresentam flagelo rudimentar, possuem cinetoplasto em forma de bastão e se multiplicam nos vacúolos fagocíticos no interior de células do sistema fagocítico-mononuclear, podendo ser encontradas no interior de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas dos hospedeiros mamíferos (BEIL, W. J., 1992).

Para que ocorra a transmissão do parasito, os insetos vetores flebotomíneos fêmeas são, no primeiro momento, infectados por formas amastigotas de *Leishmania* spp. Esta infecção ocorre durante o processo de alimentação, quando através do repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, os artrópodes ingerem fagócitos contendo os parasitos (Figura 7)

(ASSIS et al., 2021). No interior do sistema digestório do vetor, as formas amastigotas do parasito irão se transformar em formas promastigotas procíclicas, estas que são as formas ainda não infecciosas, porém com um potencial altamente proliferativo dentro do intestino médio do flebotomíneo (ASSIS et al., 2021). As formas procíclicas migram para probóscide, onde se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas, estágio este considerado infeccioso. Quando o vetor, agora infectado, realizar uma nova alimentação por meio do repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas, que possuem elevada motilidade e capacidade migratória, penetram a derme do hospedeiro mamífero não infectado. Após adentrarem, são fagocitadas por neutrófilos ou macrófagos do hospedeiro e, ainda dentro dos fagolisossomos, sofrem diferenciação celular por divisão binária, resultando na forma intracelular amastigota. As formas amastigotas são liberadas no meio extracelular após o rompimento da célula, ocasionado por lise celular. Nesse período as amastigotas atingem a corrente sanguínea, podendo ser fagocitadas por outras células do sistema imune, dando início as manifestações clínicas da doença. Os parasitos podem, a partir desse momento, ser ingeridos por um novo vetor flebotomíneo, completando assim o ciclo biológico do parasito *Leishmania* e iniciando uma próxima infecção com o reinício do ciclo (Figura 7) (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; BATES, 2007; ASSIS et al., 2021; CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022).

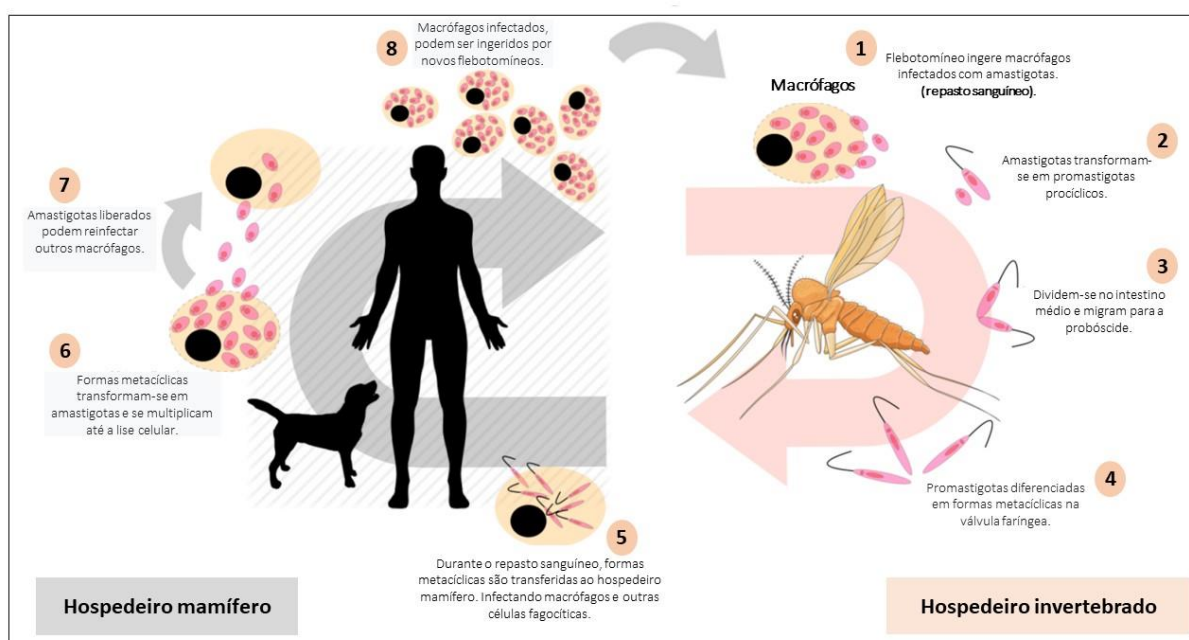


Figura 7 – Ciclo biológico do parasito do gênero *Leishmania* spp. (1) Durante o repasto sanguíneo os vetores flebotomíneos fêmeas, são infectados com as formas amastigotas do parasito. (2) Formas amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas no interior do sistema digestório do vetor. (3) Formas promastigotas procíclicas com alto potencial proliferativo, dividem-se no intestino médio do vetor e migram para a probóscide. (4) Formas promastigotas procíclicas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas (forma infecciosa) na válvula faríngea do vetor. (5) Durante um novo repasto sanguíneo as formas metacíclicas infectam a corrente sanguínea de um hospedeiro mamífero, ocorre a fagocitose por células do sistema fagocitário mononuclear. (6) Nas células

fagocíticas, ocorre a diferenciação de formas metacíclicas para formas amastigotas, estas que se multiplicam até que ocorra lise celular. (7) Reinfecção de outras células e tecidos do hospedeiro. (8) Início de um novo ciclo de infecção, quando as células infectadas são ingeridas por novos flebotomíneos durante um novo repasto sanguíneo. Adaptado de ASSIS et al., (2021).

### 3.3 Manifestações clínicas das leishmanioses

As manifestações clínicas das leishmanioses estão em sua maioria associadas ao estado imunológico do hospedeiro, à espécie infectante do parasito e ao próprio metabolismo do vetor transmissor (ROSSI; FASEL, 2018). São múltiplos os fatores que podem determinar a patogenia dessas doenças provocadas pelos parasitos do gênero *Leishmania*: características genéticas, alterações ambientais que possam vir a influenciar na proliferação dos parasitos e/ou vetores, assim como também a microbiota intestinal do flebotomíneo e a composição da saliva desses artrópodes; fatores estes que podem apresentar grande relação na intensidade da infecção e inclusive o prognóstico da doença (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022).

O intestino médio dos flebotomíneos, onde durante o ciclo biológico do parasito ocorre a proliferação das formas promastigotas procíclicas, abriga uma diversificada comunidade microbiológica. Tal diversidade permite a colonização dos parasitos *Leishmania*, assim como outros microrganismos e componentes que possibilitam potencializar e estabelecer a infecção no hospedeiro mamífero (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022). Isso se deve, a evolução de um quadro inflamatório que passa a se desenvolver após a picada, provocado por influência de inúmeras proteínas salivares, afetando a hemostasia e até mesmo modulando a imunidade do hospedeiro (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022).

A infecção causada pelos vetores transmissores e tal interação existente entre os múltiplos fatores, pode evoluir a diferentes manifestações clínicas das leishmanioses, podendo se apresentar sob diferentes formas, sendo elas: leishmaniose tegumentar (LT), que abrange as formas cutâneas (LC), cutânea-difusa (LCD) ou mucosa (LM) da doença e a leishmaniose visceral (LV). No Brasil, a LT pode ser causada pelas espécies de *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. guyanensis*, entre outros. Enquanto a LV é causada pelas espécies de *L. infantum* e *L. donovani* (GRIMALDI; TESH, 1993).

#### 3.3.1 Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar (LT)

O período de incubação da leishmaniose tegumentar em humanos, pode apresentar variações entre duas semanas a dois anos de incubação, até que se iniciem os sintomas (PAHO,

2022c). A leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais comum dentre as diferentes manifestações (OPAS, 2022). Atualmente é endêmica em 18 países em todo o mundo, ocorrendo em cerca de 90% dos casos de pacientes diagnosticados com a LT (PAHO, 2020). É caracterizada por apresentar lesões localizadas, únicas ou múltiplas, que podem iniciar como protuberâncias, evoluindo para nódulos bem arredondados e na maioria das vezes indolores. As lesões podem sofrer modificações em suas características morfológicas ao longo do tempo, alterando inclusive de tamanho. As úlceras desenvolvidas, apresentam bordas altas, arredondadas, de aparência granular e indolor (OPAS, 2022).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) é considerada a forma mais rara dentro das manifestações de LT. É caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplas lesões satélites, podendo cobrir grandes porções da pele (ALVAR et al., 2008). Em sua maioria, as lesões são nodulares, com abundância de amastigotas e não evoluem a ulceração. A falta do desenvolvimento de úlceras e a proliferação exacerbada de amastigotas na lesão, pode estar diretamente relacionada a ineficiência ou ausência de uma resposta imune do hospedeiro, ocorrendo dessa forma em pacientes considerados anérgicos. Como consequência, na grande maioria dos casos, torna-se altamente resistente aos tratamentos, apresentando frequentemente recidivas e tornando difícil o tratamento (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A leishmaniose mucosa (LM) é a forma considerada mais grave dentre as LT, prevalente em países da América do Sul. Tal manifestação, é caracterizada por acometer mucosas do trato respiratório superior e digestivo, podendo evoluir para perfuração tecidual, com consequente morbidade dos pacientes (ALVAR et al., 2008). As lesões podem afetar o septo nasal, porções do palato, faringe, laringe, lábios, traqueia ou genitálias. A progressão da doença pode dificultar o processo de deglutição, fala, aspiração e levar a desfiguração da face de forma grave. A LM, apresenta também dificuldade na melhora frente aos tratamentos, sendo necessária em muitos casos, a implementação de terapias secundárias (PAHO, 2022c; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

### **3.3.2 Manifestações clínicas da leishmaniose visceral (LV)**

Dentre as diferentes manifestações clínicas das leishmanioses a forma visceral é considerada a mais grave devido à sua alta letalidade, alcançando 95% dos casos quando aguda e não tratada (TORRES-GUERRERO, et al., 2017). Seu período de incubação pode variar de dias até 2 anos, para que ocorra a manifestação dos sintomas. Entretanto, na maior parte dos casos, esse período leva em torno de no máximo 2 meses (TORRES-GUERRERO, et al., 2017).

A LV apresenta um amplo espectro clínico, desde sintomas leves e brandos, á moderados e graves (PAHO, 2022b). Dentre as manifestações clássicas da doença, encontra-se febre, aumento de baço e fígado, quadros classificados por esplenomegalia e hematomegalia, respectivamente, além de anemia grave e leucopenia (PAHO, 2022b). Alguns sintomas também descritos na literatura, podem incluir perda de peso devido a desnutrição, além de problemas respiratórios e/ou distúrbios gastrointestinais (PAHO, 2022b). Em pacientes coinfectados com LV/HIV, outros sintomas podem ocorrer, como comprometimento da infecção em locais atípicos como: pulmão, cavidades peritoneais e trato gastrointestinal (PAHO, 2022b; SASIDHARAN; PRAKASH SAUDAGAR, 2021).

Nas diferentes formas de manifestações das leishmanioses, fatores como o estado imunológico do hospedeiro são importantes determinantes da patogenia das doenças. Entretanto, na LV, pacientes imunossuprimidos, crianças e idosos tendem a ser mais propensos a desenvolver manifestações viscerais (VON STEBUT, 2015).

### 3.4 Aspectos imunológicos das leishmanioses

As infecções causadas pelos parasitos do gênero *Leishmania*, induzem fortes respostas humorais, que por sua vez demonstram não desempenhar a função de proteção, e sim, podem estar relacionados a formas não resolutivas das doenças (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007). Durante a resposta imune frente a infecção por patógenos intracelulares, ocorre interação entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T, que culminam na ativação de inúmeras vias bioquímicas, o qual sintetizam moléculas como citocinas e óxido nítrico, visando resolver a infecção. Na leishmaniose, esses mecanismos de defesa comuns são comprometidos, de forma que para a sobrevivência do patógeno as funções imunológicas do hospedeiro são suprimidas (GANGULI et al., 2015).

Na resposta anti-leishmania, uma variedade de componentes e vias são envolvidos e/ou ativados, desde elementos da imunidade celular mediada tanto por células que participam da imunidade inata, incluindo principalmente macrófagos, células dendríticas (CDs) e neutrófilos, assim como componentes da imunidade adaptativa, incluindo os linfócitos T, onde o equilíbrio dos subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> atuam principalmente no processo de cicatrização (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; YASMIN et al., 2022). Frente a um desequilíbrio, as T CD4<sup>+</sup> podem ser cruciais na resposta de resistência, enquanto as células T CD8<sup>+</sup> apresentam um importante papel na eliminação de *L. donovani* por exemplo, onde a perda de função desses linfócitos está associada a piora da doença (ANAND et al., 2023). A resposta imune citotóxica

desenvolvida por T CD8<sup>+</sup>, está também relacionada a expressão de granzimas, além de influenciar diretamente na resposta inflamatória (FERRAZ et al., 2022).

Os mecanismos responsáveis por uma maior susceptibilidade ou resistência a evolução da infecção provocada pelas leishmanioses, assim como os fatores que determinam tal evolução, ainda não se encontram totalmente elucidados. No entanto, sabe-se que podem ocorrer diferentes respostas frente a infecção, podendo ser influenciadas por mecanismos que confirmam resistência ao indivíduo, e/ou maior suscetibilidade ou exacerbação (VANLOUBBEECK; JONES, 2004).

De acordo com a literatura, a resposta imune melhor descrita até o momento é a provocada por *L. major*, o qual é caracterizada por um conjunto de respostas, sendo elas do tipo Th1 e Th2 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). A ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> são importantes determinantes dos mecanismos, onde realizam a mediação conforme o padrão de citocinas presentes na lesão, enquanto células Th1 atuam na defesa do hospedeiro secretando, por exemplo IFN- $\gamma$  e IL-12, e células Th2 estão associadas a progressão da doença secretando IL-4, IL-5 e IL-10, entre outros mediadores e proteínas imunoestimulantes que sofrem alteração em sua expressão, influenciando o desfecho da doença (JAWALE; KHANDIBHARAD; SINGH, 2023; MARTINS et al., 2014). É considerável ressaltar, que a subpopulação Th17 também desempenha um importante papel na formação de lesões, por meio da produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 e IFN- $\gamma$  (JAWALE; KHANDIBHARAD; SINGH, 2023).

Nesse sentido, a resistência à infecção das leishmanioses está diretamente relacionada a produção predominante de citocinas pró-inflamatórias, que ocorrem devido a uma resposta imune do tipo Th1, no hospedeiro infectado. Tal resposta promove a ativação de macrófagos, estes que desempenham um papel central e inicial da patogênese, sendo ainda considerados nicho replicativo e células efetoras anti-leishmania (ASSOUAB; EL FILALY; AKARID, 2022; BOGDAN, 2020). Devido a exposição a citocinas Th1, os macrófagos clássicos (M1), são ativados e contribuem para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), de forma que os parasitos que se encontram no meio intracelular, são mortos devido a produção de óxido nítrico e nitrogênio (ASSOUAB; EL FILALY; AKARID, 2022; KEDZIERSKI; EVANS, 2014; MAKSOURI et al., 2017). Enquanto, uma resposta de maior suscetibilidade e exacerbação da evolução da infecção, pode estar relacionada a uma resposta imune do tipo Th2, no qual estas citocinas induzem a ativação dos macrófagos alternativos (M2), considerados responsáveis pela biossíntese de poliaminas via ativação da enzima arginase, benéficas para a proliferação de *Leishmania* e conseqüentemente desenvolvimento da doença (ASSOUAB; EL FILALY; AKARID, 2022; KROPF et al., 2005). Estudos indicam ainda, que o parasito tem alta

capacidade de expressar arginase, fundamental para as funções vitais do parasito (MUXEL et al., 2018; ROBERTS et al., 2004).

As CDs parecem também desempenhar um importante papel na resposta imune das leishmanioses. Isso se deve ao fato de que semanas após a infecção, o número de CDs tende a aumentar, devido ao elevado recrutamento para o local da lesão. Essas células auxiliam na ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em direção a uma resposta Th1, devido a expressão de inúmeros receptores de reconhecimento padrão (RRP) na superfície celular, estes que permitem reconhecer estruturas específicas de patógenos, estimulando a migração aos linfonodos, e apresentando antígenos aos linfócitos T (BANCHEREAU et al., 2000).

Entretanto, alguns estudos demonstram, que durante a evolução da infecção os parasitos desenvolveram mecanismos capazes de evitar o desempenho das funções de CDs como APCs, o que caminha para uma menor ativação dessas células e de células NK, obtendo como resultado a supressão de IL-12, assim como uma baixa produção de IFN- $\gamma$  (AFONSO; SCOTT, 1993; KEDZIERSKI; EVANS, 2014; VANLOUBBEECK; JONES, 2004).

Sobretudo, na resposta imune desenvolvida por espécies que provocam a leishmaniose visceral, como *L. infantum* e *L. donovani*, foram avaliadas em modelos animais, e dê mesma forma que em *L. major* os mecanismos relacionados a uma resistência a infecção, foram predominantes de uma resposta do tipo Th1 (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007). Por outro lado, os mecanismos relacionados ao desenvolvimento de uma maior suscetibilidade, estariam relacionados a uma possível incapacidade de desenvolver uma resposta do tipo Th1, e não necessariamente devido a uma resposta Th2 (MIRALLES et al., 1994). A presença de outros fatores como TGF- $\beta$ , possui influência na redução dos níveis de IFN- $\gamma$ , o que pode aumentar a concentração de IL-10, e permitir a redução da resposta Th1 durante a infecção por LV (VANLOUBBEECK; JONES, 2004; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005).

Outros fatores também influenciam em tal resposta, como a modificação de expressão de proteínas que interferem no desfecho da doença, como por exemplo os receptores de membrana B7 e CD40 que atuam na atividade antiparasitária, quando pouco ou não expressos, podem interromper a formação do complexo de ataque à membrana, interferindo na via Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK/STAT) em macrófagos. Como resultado impedem a cascata de citocinas e modificam perfis de expressão de citocinas e quimiocinas (JAWALE; KHANDIBHARAD; SINGH, 2023).

Por fim, a resposta imunológica provocada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, pode ser influenciada por múltiplos fatores, que são capazes de determinar o desfecho, seja em uma resposta susceptível ou resistente às infecções. A própria genética do hospedeiro pode ser



um agravante, porém ainda não são totalmente compreendidos todos esses possíveis componentes e mecanismos imunológicos frente as leishmanioses (KEDZIERSKI; EVANS, 2014).

### 3.5 Coinfecção LV com HIV: aspectos gerais

O HIV é um vírus de RNA pertencente à família Retroviridae e de gênero *Lentivirus* (OKWOR; UZONNA, 2013). Sua transmissão pode ocorrer por meio do contato entre fluidos corporais com indivíduos infectados (PAHO, 2022e). Desde a sua primeira epidemia, o vírus é responsável por causar em torno de 25 milhões de mortes no mundo. Sendo que no Brasil, desde 1990, o número de óbitos encontra-se em torno de 11 mil ao ano (COSTA et al., 2010).

Até o presente momento o HIV ainda continua sendo um problema de saúde pública mundial. Os esforços no desenvolvimento de novas tecnologias e empenho no controle da disseminação de tal infecção, como o surgimento da terapia antirretroviral (TARV) e elevado monitoramento, tem possibilitado maior eficácia no combate à transmissão (OKWOR; UZONNA, 2013). Entretanto, as terapias existentes visam controlar a transmissão e progressão da infecção, promovendo maior longevidade e qualidade de vida destes pacientes, o que não os isenta da infecção viral existente no organismo, e principalmente da suscetibilidade a novas infecções (UNAIDS, 2019). De acordo com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), os dados mais recentes apontam que 1,5 milhões de pessoas foram infectadas com HIV no ano de 2021, 38,4 milhões de pessoas vivem com o vírus e 650 mil pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS em 2021 (UNAIDS, 2023).

O HIV provoca uma infecção responsável por atacar diretamente o sistema imunológico humano, infectando principalmente as células T CD4<sup>+</sup>. Comprometendo o funcionamento dessas células, a infecção acaba evoluindo para uma elevada depleção do sistema imunológico, resultando na imunodeficiência (OKWOR; UZONNA, 2013). Nos estágios iniciais da doença, não necessariamente os indivíduos apresentam sintomas, entretanto, à medida que ocorre a progressão e imunossupressão, alguns sintomas podem surgir, desde sinais gripais como febre, dor de cabeça e garganta, como também inchaço de gânglios linfáticos, perda de peso e diarreia (PAHO, 2022e). A evolução da infecção, pode culminar no estágio mais avançado da contaminação por HIV que é o desenvolvimento da AIDS, podendo levar dentro de 10 a 15 anos para atingir tal estágio. A progressão da imunossupressão desencadeada pelo vírus, possibilita uma maior suscetibilidade a infecções oportunistas, como contaminações bacterianas, fúngicas, alguns tipos de câncer e doenças infecciosas, como é o caso das leishmanioses (OKWOR; UZONNA, 2013; WHO, 2022e).

A incidência de coinfeção das leishmanioses com HIV tem se intensificado cada vez mais ao longo dos anos, e isso se deve em parte, pela sobreposição geográfica de ambas as doenças infecciosas. Devido à alta abrangência das leishmanioses em áreas endêmicas, indivíduos com o vírus HIV são mais propensos a desenvolver LV e LT, quando comparado a pessoas não infectadas pelo vírus. A coinfeção com a espécie *L. infantum*, responsável por desenvolver a LV, é considerada uma das infecções mais frequentes em indivíduos imunossuprimidos devido a presença do vírus HIV no organismo (DESJEUX; ALVAR, 2003; OKWOR; UZONNA, 2013).

A LV é considerada, dentre as diferentes manifestações, a mais oportunista, em indivíduos imunossuprimidos pela infecção pelo vírus HIV, e tende a se intensificar ainda mais. As interações do protozoário são facilitadas devido a ação do vírus HIV, que leva a redução de linfócitos TCD4+, favorecendo a replicação viral e oferecendo melhores condições para sobrevivência e multiplicação do protozoário no organismo (RAMOS et al., 2021). Frente a este cenário, o protozoário estimula uma ativação imune crônica, enquanto o vírus leva ao aumento da produção de moléculas imunomoduladoras, resultando na progressão rápida para um estágio mais agravado da infecção, que culmina no desenvolvimento da AIDS (OKWOR; UZONNA, 2013).

Em um quadro de coinfeção LV/HIV, devido a depleção do sistema imune e as melhores condições oferecidas a multiplicação do parasito *Leishmania*, pode ocorrer a modulação de inúmeras moléculas da superfície celular, assim como as CDs e os fagócitos mononucleares (GARG; TRUDEL; TREMBLAY, 2007). Essas células atuam principalmente como APCs, e possuem um importante papel em exibir antígenos na superfície celular, para que ocorra a posterior ativação de linfócitos T imaturos, em busca de promover uma resposta imune eficiente (OKWOR; UZONNA, 2013). Entretanto, quando esses patógenos atuam em conjunto, permitem alterar as funções dessas células, levando ao déficit nas capacidades de processamento e apresentação de antígenos. Além de influenciar diretamente em um descontrole na produção de inúmeros fatores e componentes celulares, como o atraso e disfunção na fusão lisossomal, o vírus HIV permite ainda afetar os mecanismos de replicação do parasito *Leishmania* (AZZAM et al., 2006; GARG; TRUDEL; TREMBLAY, 2007; KEDZIERSKA et al., 2003; KEDZIERSKA; CROWE, 2002). A depleção do status imunológico desses pacientes, dificulta inclusive e principalmente no diagnóstico da infecção por leishmaniose, já que em casos de coinfeção a produção de anticorpos contra proteínas de *Leishmania* encontra-se em uma menor quantidade (RAMOS et al., 2021).

### 3.6 Medidas de controle e profilaxia nas leishmanioses

A transmissão do parasito *Leishmania* ocorre por meio de um sistema biológico extremamente complexo que envolve inúmeros fatores, como o habitat do vetor artrópode e sua capacidade de adaptação, influências climáticas e ecológicas nas regiões endêmicas, além de outras características individuais comportamentais do vetor, dos reservatórios mamíferos e do hospedeiro (WHO, 2020). Para que se promovam medidas com um eficiente controle e profilaxia sobre as infecções provocadas pelas leishmanioses, é necessária uma combinação de estratégias atuantes em conjunto. O monitoramento desses fatores, como de aspectos ambientais, demográficos e comportamentais humanos permitem contribuir em uma melhora no cenário da propagação das leishmanioses (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

Atualmente as principais estratégias profiláticas para essas doenças, baseiam-se em medidas de controle dos vetores transmissores, como uso de mosquiteiros tratados com inseticidas e pulverização frequente nas residências, além de uma melhor gestão ambiental, que promova um monitoramento desses vetores e reservatórios existentes na região, bem como a própria proteção individual por meio do uso de repelentes (TESH RB, 1995; WHO, 2020).

Na maioria das regiões endêmicas para as leishmanioses, medidas de controle simples que não atuam em conjunto com outras propostas, normalmente não são eficazes. É necessária uma vigilância efetiva para essas doenças, para que assim, seja realizado um monitoramento epidemiológico com maior atenção as taxas de letalidade, índices de notificações e um acompanhamento ativo sobre os pacientes, desde o diagnóstico até o fim do processo terapêutico (WHO, 2021). Para que se possa obter bons resultados frente a estes monitoramentos, é também importante promover maior mobilização social, levando informações para a população na busca por maior conscientização (WHO, 2021).

O controle de reservatórios do parasito *Leishmania* em áreas de maior endemicidade, é também uma importante estratégia que tem sido adotada na prevenção das infecções. Entretanto, a aplicação de métodos de controle desses reservatórios, vai de acordo com os diferentes animais atuantes em cada região, dentre eles cães e roedores são considerados os principais. Para tal, métodos como o uso de iscas venenosas e armadilhas para roedores são bastante utilizados (GONZÁLEZ et al., 2015). Todavia, os cães são considerados principais reservatórios domésticos desses parasitos, e acabam contribuindo para a manutenção da doença no ambiente urbano e periurbano. Isso se deve ao fato de serem hospedeiros mais susceptíveis à infecção e por apresentarem elevado parasitismo cutâneo, mesmo na ausência de sinais ou sintomas da doença (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; ELMAHALLAWY et al., 2014).

Medidas como o uso de coleiras antiparasitárias a base de inseticidas, como por exemplo deltametrina, são também recomendados para cães acima de 7 meses, entretanto podem apresentar efeitos adversos ou quadros de intoxicação no caso de ingestão (OLIVEIRA et al., 2019). Sobretudo, ainda há grande necessidade de novas ferramentas a serem aplicadas e desenvolvidas para promover uma melhor vigilância e controle das leishmanioses zoonóticas, já que a eutanásia de animais domésticos também não é uma medida ética e coerente, inclusive pelo baixo impacto que podem apresentar nos efeitos quanto a transmissão das leishmanioses (GRAMICIA; GRADONI, 2005; MOREIRA et al., 2004).

Devido as diferenças nas apresentações clínicas das leishmanioses, variedade de espécies, vetores e reservatórios, bem como a diferenciação no ciclo de transmissão, ações com maior impacto devem ser utilizadas em conjunto. Nesse cenário, é necessário maior empenho socioeconômico, voltado a pesquisas no desenvolvimento de novos testes diagnósticos eficazes e acessíveis, que possam garantir resultados fidedignos e precoces, evidenciando o início de tratamentos em estágios iniciais da doença, permitindo acompanhar a evolução desses pacientes e prevenindo possíveis recidivas. É também importante o desenvolvimento de novas tecnologias vacinais, tanto para humanos quanto para cães, visando uma maior profilaxia, além de tratamentos viáveis, que possam ser melhor gerenciados quanto a entrega e qualidade a população (OPAS, 2021).

### 3.7 Tratamento e prognóstico das leishmanioses e coinfeção LV/HIV

A infecção desenvolvida pelo parasito *Leishmania* é conhecida a muitos anos entre a população mundial, mesmo sendo relada como DTN relativamente antiga em nosso meio, seu tratamento ainda continua sendo desafiador. O tratamento, assim como um diagnóstico eficaz, são um dos principais e mais importantes métodos, considerados cruciais no controle e prognóstico emergencial das leishmanioses, porém também são considerados dentre os maiores desafios (PRADHAN et al., 2022). Atualmente, os medicamentos e terapias disponíveis enfrentam dificuldades em sua aplicabilidade, desde custos elevados, baixa eficácia, alta toxicidade, desenvolvimento de múltiplos efeitos adversos, administração invasiva, dificuldade na adesão e resistência a medicamentos em alguns casos (PRADHAN et al., 2022).

Na LVH dentre os medicamentos de primeira opção preconizados atualmente, encontram-se os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ), e como subsequentes opções terapêuticas a pentamidina, anfotericina B lipossomal e anfotericina B desoxicolato (PAHO, 2022d). Na LTH, os antimoniais pentavalentes também são priorizados, estes encontram-se em duas diferentes

formulações, sendo o antimoniato N-metilglucamina e estibogluconato de sódio, comercialmente conhecidos como Glucatime e Pentostan, respectivamente (PAHO, 2022f). Outras drogas adicionais são também consideradas, como isetionato de pentamidina, miltefosina e as diferentes formulações de anfotericina B, assim como no tratamento da LV (PAHO, 2022f).

Nenhum dos fármacos utilizados no momento possuem potencial suficiente para eliminar completamente o parasito, além de ser necessário um monitoramento completo das múltiplas condições clínicas do paciente, que incluem avaliação do status imunológico, gravidez e possibilidade de coinfeção com outras doenças infecciosas. Os métodos terapêuticos atualmente aplicados, possuem como principal objetivo promover a redução da carga do parasito no organismo do indivíduo infectado, na busca pela resolução da lesão ou controle do desenvolvimento de uma infecção sistêmica, como é o caso da LV (PAHO, 2022f).

Os antimoniais pentavalentes são medicamentos de primeira linha no tratamento das leishmanioses e possuem como princípio ativar a via clássica de macrófagos, permitindo matar os parasitos responsáveis pela infecção. Em um segundo momento do tratamento, o Sb (V), considerado um pró-fármaco, é reduzido ao Sb (III) ativo, que tem como alvo a inibição da tripanotona redutase, responsável por levar o parasito à morte (MADUSANKA; SILVA; KARUNAWEEERA, 2022). Esses fármacos já demonstraram em alguns estudos, cerca de 60% de irresponsividade, além de inúmeros efeitos colaterais comprovados, como: vômitos, náuseas, dor abdominal, mal-estar, mialgia, cefaleia, letargia, além de alterações eletrocardiográficas e cardiotoxicidade, que podem variar quanto a dose e duração do tratamento (MANDAL et al., 2015). A adesão ao tratamento é também uma grande dificuldade pertinente nessas DTN, visto que muitos pacientes não possuem fácil mobilidade até os centros de saúde especializados, sendo que o período de tratamento é relativamente longo, podendo durar até 40 dias, além de a aplicação ocorrer por vias de administração intramuscular ou endovenosa, vias estas consideradas invasivas e dolorosas (MANDAL et al., 2015; TAVARES; FERNANDES; MELO, 2003).

Como medicamento de segunda linha, encontra-se a anfotericina B, que apresenta importante função em espectros de atividades antiparasitárias e antifúngicas, utilizada na maioria das vezes em pacientes com resistência aos antimoniais pentavalentes de primeira opção (BERMAN, 1997; MADUSANKA; SILVA; KARUNAWEEERA, 2022). Considerada uma droga eficiente no tratamento das leishmanioses, leva a morte do parasito por meio do extravasamento de íons, através de alterações na permeabilidade da membrana celular (COUKELL; BROGDEN; BERMAN, 1998; MADUSANKA; SILVA; KARUNAWEEERA, 2022; SHIRZADI, 2019). Assim como os demais fármacos, possui efeitos colaterais como a indução de

toxicidade aguda e crônica, além de febre, nefrotoxicidade, hipocalcemia e miocardite, necessitando de hospitalização dos pacientes (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; MADUSANKA; SILVA; KARUNAWEEERA, 2022). Outras formulações, como por exemplo a anfotericina B lipossomal (AmBisome™), tem sido também utilizado, visando promover uma menor toxicidade medicamentosa (GHORBANI; FARHOUDI, 2018).

A miltefosina foi um dos primeiros medicamentos de uso oral a serem utilizados no tratamento da LVH. Atualmente é uma droga de terceira linha na terapia das leishmanioses. Utilizada também como anticancerígeno, é considerada por ter efeitos teratogênicos a longo prazo, podendo inclusive promover a resistência a alguns outros medicamentos. Entretanto, possui vantagens como uma curta duração do tratamento e sua administração ser via oral, tornando-o mais acessível (GHORBANI; FARHOUDI, 2018).

A terapia combinada também é uma alternativa utilizada principalmente em pacientes coinfectados com LV/HIV ou que desenvolveram resistência aos medicamentos de primeira linha. Normalmente, baseiam-se na administração de anfotericina B lipossomal, seguida de miltefosina, ou ainda diferentes doses de anfotericina B lipossomal. Em pacientes com coinfeção de LV/HIV, normalmente ocorre a aplicação do tratamento até que encontrem níveis de células T CD4<sup>+</sup> considerados adequados, garantindo que houve restauração imunológica no organismo do paciente (GHORBANI; FARHOUDI, 2018; QUEIROZ; LUZ, 2022). A depleção de células T CD4<sup>+</sup>, em pacientes coinfectados com LV/HIV, é uma grande limitação no diagnóstico da LV, já que a imunossupressão desenvolvida leva a uma redução de anticorpos antileishmania circulantes, levando ao atraso na detecção, e conseqüentemente no início adequado do tratamento. Vale ressaltar ainda, a alta probabilidade do desenvolvimento de resistência medicamentosa em pacientes com leishmanioses, podendo estar relacionado a menor absorção dos fármacos, rápida taxa metabólica ou até superexpressão dos transportadores do fármaco (THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020).

Cabe ressaltar a importância do prognóstico frente aos tratamentos realizados, de forma que o acompanhamento sorológico após e/ou durante a terapia das leishmanioses deve ser considerado no controle frente a resposta terapêutica, assim como critério de cura clínica do paciente (DIDWANIA et al., 2020; MACHADO et al., 2020a). Atualmente, os kits diagnósticos disponíveis no mercado não apresentam eficácia suficiente na distinção sorológica entre pacientes curados e em evolução de tratamento, indicando uma reatividade de anticorpos moderada a alta (REITER-OWONA et al., 2016; SANTOS et al., 2021; VALLUR et al., 2014). Isso se deve, pelo fato de que os anticorpos anti - *Leishmania* nesses pacientes geralmente tendem a

permanecer positivos por meses e/ou até anos após o tratamento, impossibilitando a diferenciação entre infecções atuais e curadas (DIAS et al., 2018).

Até o momento alguns estudos preliminares apontam o importante potencial de algumas proteínas hipotéticas utilizadas em suas formas recombinantes e o desenvolvimento de peptídeos provenientes dessas sequências proteicas, onde alguns resultados promissores demonstraram diminuição significativa dos níveis de anticorpos em amostras de pacientes tratados de LV após seis meses, quando comparado a amostras de indivíduos saudáveis (DIAS et al., 2018; MACHADO et al., 2020b; SANTOS et al., 2021). Resultados como esses evidenciam cada vez mais, a necessidade do estudo de novos marcadores mais eficientes na detecção e diferenciação entre os níveis de infecção das leishmanioses.

### 3.8 Diagnóstico das leishmanioses: aspectos gerais

Tendo em vista as inúmeras dificuldades encontradas no controle das leishmanioses, o diagnóstico preciso e rápido se torna primordial. O diagnóstico deve ser uma ferramenta de linha de frente como um dos principais métodos de controle emergencial, assim como no prognóstico para um efetivo acompanhamento durante as terapias farmacológicas, além de ser um fator decisivo para o início de tratamentos precoces (TRIPATHI et al, 2007). Embasado nessa realidade e devido à grande heterogeneidade existente entre as leishmanioses, protocolos de diagnóstico por meio de ferramentas sensíveis e específicas, que permitam detectar de forma eficiente, devem ser considerados prioridade em regiões endêmicas das doenças (TAVARES; 2003).

Testes eficazes necessitam de valores consideráveis relacionados a sua sensibilidade correspondendo aos resultados positivos dentre pacientes com a determinada doença, assim como alta especificidade garantindo resultados negativos em pacientes que de fato não apresentem a doença em questão (GUIMARÃES, 1985). Determinadas características proporcionadas por ferramentas diagnósticas, favorecem a exatidão dos resultados, evitando consequentemente falsos-negativos e/ou falsos-positivos fato este que ocorre com frequência da detecção das leishmanioses (TAVARES; 2003).

O diagnóstico de ambas as leishmanioses, seja tegumentar ou visceral, ocorre através da análise clínica conjugada à métodos laboratoriais. No diagnóstico clínico, devem ser levantadas informações do paciente, como dados pessoais relacionados a sinais e sintomas sugestivos as diferentes manifestações das doenças, e principalmente informações quanto a viagens ou permanência do paciente em áreas endêmicas. Os métodos laboratoriais, em indivíduos com

suspeita de LTH, são realizados por evidências imunológicas, histológicas ou parasitológicas, através da coleta e esfregaço de amostras retiradas do local da ferida, quando houver. No diagnóstico laboratorial da LVH, são necessários também um conjunto de informações clínicas do paciente, onde as evidências podem ser obtidas por meio de exames imunológicos e parasitológicos. Nesses casos, quando não existe ferida e não há suspeita de LTH, observa-se a presença de febre inexplicável e demais sintomas característicos, além de realizada a coleta de amostras de aspirados teciduais para detecção parasitológica (OPAS, 2022; WHO, 2010).

Outras técnicas são também aplicadas, como a detecção de kDNA de *Leishmania* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), além de testes imunológicos como a imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), teste de aglutinação direta (DAT) e testes imunocromatográficos (MACHADO et al., 2020a; TRAVI et al., 2018).

### 3.8.1 Exame parasitológico

Não existem testes diagnósticos suficientemente sensíveis e específicos, considerados padrão ouro a todas as leishmanioses. Por isso se faz necessário uma associação de informações, sendo o exame parasitológico atualmente considerado o diagnóstico referência para a detecção das diferentes leishmanioses em todo o mundo. Os exames parasitológicos, podem ser feitos por meio de exame direto ou isolamento em cultura (*in vitro*). É um teste realizado por meio de microscopia ótica e apresenta elevada especificidade, devido ao fato de o princípio desse teste basear-se na detecção direta do parasito (SRIVASTAVA et al., 2011; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020).

As amostras mais utilizadas para a aplicação do exame parasitológico são medula óssea ou aspirados esplênicos. Sobretudo, formas amastigotas já foram encontradas em amostras de sangue periférico, linfonodos e biópsias hepáticas (BARRETT; CROFT, 2012; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). Uma maior sensibilidade para o teste é observada em aspirados esplênicos, com cerca de 93 a 99%, entretanto, é um diagnóstico extremamente invasivo e de alto risco e, apesar de ser considerado uma fonte abundante de parasitos, tal coleta pode causar hemorragia e levar o paciente a óbito (BARRETT; CROFT, 2012; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). Além disto, as formas amastigotas nem sempre são encontradas nas amostras coletadas, levando a uma sensibilidade variável, onde 20% a 40% dos pacientes apresentam resultados falso-negativos (BARÇANTE et al., 2019; GOTO; LINDOSO, 2010; MARTINS et al., 2014; MELLO, 2015).



### 3.8.2 Exame molecular

Devido as inúmeras dificuldades encontradas no diagnóstico parasitológico, metodologias moleculares surgiram como alternativas na busca de uma maior sensibilidade e viabilidade para detecção das leishmanioses. Os exames moleculares atualmente necessitam de uma menor quantidade de amostra, além de não serem tão invasivos quanto a forma de coleta, podendo ser utilizado a partir de qualquer amostra biológica, além de permitir detectar amostras de DNA em ambas as formas morfológicas do parasito, sejam elas amastigotas e/ou promastigotas (TAVARES, 2003). A detecção do material genético do parasito por PCR, permitiu melhorar o diagnóstico dessas doenças, demonstrando uma sensibilidade e especificidade que pode alcançar até 90% em amostras de medula óssea, sangue periférico e amostras leucocitárias; entretanto, esses valores podem apresentar variações de acordo com as características da amostra biológica e a forma de coleta (SUNDAR; SINGH, 2018). Outras limitações encontradas, são também quanto a qualidade dos *primers* específicos utilizados para amplificação da sequência alvo, que em sua maioria utiliza-se de DNA nuclear, podendo influenciar diretamente na eficiência desses ensaios (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; SCHALLIG; OSKAM, 2002; SUNDAR; SINGH, 2018).

Sobretudo, essas plataformas moleculares continuam evoluindo a cada dia, devido a inúmeras análises de sequenciamento genético realizados dentro da diversidade de espécies que abrangem o gênero *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2017; SUNDAR; SINGH, 2018). A PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR), torna-se uma das técnicas com maior eficácia e facilidade na diferenciação entre as espécies do parasito infectante, principalmente quando comparado ao PCR convencional. A RT-PCR permite determinar a carga parasitária presente nas amostras, sendo assim um indicativo entre doença clinicamente ativa e infecção assintomática, possibilitando ser um determinante não só diagnóstico, mas também prognóstico de pacientes tratados que necessitam de acompanhamento na detecção de uma possível cura (GOTO; LINDOSO, 2014).

Os exames moleculares em geral demonstram dificuldade quanto a padronização de técnicas e protocolos nos centros de saúde. Para que se possa atingir resultados confiáveis, com sensibilidade e especificidade desejável, são necessários controles de qualidade internos e externos, que se tornam indispensáveis (GOTO; LINDOSO, 2014). Para efetiva aplicabilidade, profissionais treinados e equipamentos sofisticados são essenciais. Nesse sentido, para que se obtenha uma total infraestrutura desejável, estes testes demandam um elevado custo unitário, dificultando assim o seu uso em larga escala, principalmente em ambientes com recursos

limitados, como em países menos desenvolvidos (SRIVIDYA et al., 2012; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020).

### 3.8.3 Diagnóstico imunológico

Os testes sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos produzidos por meio de uma resposta humoral no organismo do hospedeiro infectado com o parasito do gênero *Leishmania* (ELMAHALLAWY et al., 2014; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020).

Em áreas endêmicas, a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de pacientes infectados, demonstra alta eficácia principalmente em indivíduos com LV (ELMAHALLAWY et al., 2014). São considerados testes de fácil aplicabilidade e acessibilidade (ELMAHALLAWY et al., 2014; LIMA et al., 2018). No entanto, em pacientes infectados com LTH, os testes sorológicos não apresentam sensibilidade elevada, e isso se deve aos menores níveis de anticorpos presentes (BRACAMONTE et al., 2020; FONSECA et al., 2014). Além disso, a especificidade pode ser variável em ambas as doenças, devido a presença de antígenos similares em outras espécies, o que pode levar a elevados índices de reação cruzada, e a resultados falso-positivos, como é o caso de doenças de Chagas, hanseníase, malária, tuberculose, histoplasmose, aspergilose, entre outras (ALMEIDA-PAES et al., 2007; BRACAMONTE et al., 2020; FONSECA et al., 2014; HUMBERT et al., 2019; LIMA et al., 2018).

Mesmo diante das limitações que são enfrentadas nestes testes, as técnicas sorológicas disponíveis permitem proporcionar uma elevada acurácia e altas taxas de sensibilidade e especificidade, principalmente quando avaliadas em conjunto com outras características diagnósticas do paciente (EYAYU et al., 2022). Existem várias técnicas utilizadas atualmente com princípios imunológicos, dentre estas o ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), imunofluorescência indireta (IFAT, do inglês *Indirect Fluorescent Antibody Test*), teste de aglutinação direta (DAT, do inglês *Direct Agglutination Test*), Western Blot e os testes imunocromatográficos (GOTO; LINDOSO, 2010; SAVOIA, 2015; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). Em geral, a sensibilidade entre os testes varia de acordo com o antígeno e a metodologia aplicada, podendo o RIFI apresentar 43 a 58%, ELISA de 40 a 88%, DAT de 61 a 95% e Blot de 75 a 91% (BRASIL, 2015). Quanto a especificidade, também dependem diretamente do antígeno incorporado no teste sorológico (ELMAHALLAWY et al., 2014).

Dentre os métodos sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, são disponibilizados no Brasil pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o teste imunocromatográfico rápido baseado no antígeno recombinante rK39, e o teste RIFI, distribuído através do kit IFI

Leishmaniose Humana – Bio-Manguinhos, produzido pela Fiocruz e o teste de ELISA (LÉVÊQUE et al., 2020; BRASIL, 2022). O diagnóstico por RIFI para LV varia quanto a sensibilidade de 80 a 95%, e em pacientes coinfectados de 50 a 60%, enquanto os demais testes rápidos a base do antígeno de rK39 por exemplo, não foram validados no contexto de coinfeção, devido a apresentar sensibilidade na faixa de 45% nos últimos estudos de população do Brasil (BRASIL, 2004; BRASIL, 2015).

Dentre os testes sorológicos rápidos atualmente disponíveis, estes são a base de proteínas recombinantes, como por exemplo o (TR DPP®) um teste para leishmaniose canina a base dos antígenos rk39, rK26 e rK16 (SARKARI; REZAEI; MOHEBALI, 2018). Essas proteínas são relacionadas à superfamília de proteínas cinesina, encontradas nas várias espécies de *Leishmania* (BLAINEAU et al., 2007). Para LV existem também outros testes atualmente comercializados como Kalazar Detect (InBios International Inc., EUA) e IT Leish (Bio-Rad), ambos a base da proteína rK39 (REZAEI, et al, 2022). Dentre os antígenos disponíveis, a rK39 incorporada em fitas imunocromatográficas, permitiu detectar LV com elevados níveis de sensibilidade (93 a 100%) e especificidade (97 a 98%) em pacientes infectados, demonstrando um bom desempenho diagnóstico (DHOM-LEMONS et al., 2019; ZIJLSTRA et al., 2001).

Entretanto, existem ainda inúmeras outras limitações relacionadas à aplicabilidade de ambos os testes no caso do diagnóstico das leishmanioses (COURA-VITAL et al., 2013; MACHADO et al., 2020a). Além de fatores como reatividade cruzada encontrada nos testes sorológicos, muito se preocupa com a sensibilidade variável, frequentemente encontrada na detecção de pacientes tratados, uma vez que alguns deles podem manter a sorologia positiva por meses ou até anos após o fim do tratamento e cura clínica. Este torna-se um grande desafio, quanto ao acompanhamento sorológico e sobre os cuidados prognósticos de indivíduos em tratamento contra as leishmanioses, onde na maioria dos testes não é possível diferenciar de pacientes com a infecção clínica ativa (SAVOIA, 2015; PORTELA et al., 2018; TRAVI et al., 2018).

Em casos de pacientes assintomáticos, a detecção torna-se também dificultada devido aos baixos índices de sorologia anti-leishmania. O mesmo ocorre principalmente em indivíduos coinfectados com LV/HIV, onde a grande maioria dos testes sorológicos disponíveis como RIFI, testes imunocromatográficos e ELISA, já comprovaram uma menor sensibilidade em pacientes HIV positivos. Os pacientes imunossuprimidos, podem apresentar menor produção de anticorpos contra as proteínas de *Leishmania* devido a capacidade imunossupressora do vírus (RAMOS et al., 2021). Ademais, resultados inconclusivos ou falsos-positivos em indivíduos

residentes em áreas endêmicas da doença, são também relatados (PORTELA et al., 2018; SALLES et al., 2017).

Com base nessa elevada heterogeneidade quanto a resposta imune e patogênese que circundam as leishmanioses, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento de novas tecnologias voltadas ao desenvolvimento de novas medidas de controle, sendo que métodos diagnósticos eficazes são cruciais no manejo dessas doenças (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007; WHO, 2010; VALE et al., 2021; VALE et al., 2022; MEDEIROS et al., 2022).

### 3.9 Proteínas alvo utilizadas neste estudo

Diante desse cenário, frente a inúmeras limitações que norteiam as leishmanioses em suas mais diversas áreas de controle, a busca por novos candidatos antigênicos com maior sensibilidade, especificidade e que com maior abrangência de detecção entre as doenças, torna-se urgente. Partindo deste pressuposto, para que melhores plataformas diagnósticas sejam desenvolvidas, se faz necessário múltiplos estudos de um conjunto variado de novos antígenos, que podem ser eles peptídeos, proteínas recombinantes ou proteínas quiméricas. Nesse sentido, diferentes tecnologias de proteômicas e imunoproteômicas são necessárias e, atualmente, têm sido amplamente utilizadas com intuito de melhor conhecer a variedade de proteínas envolvidas no proteoma do parasito *Leishmania*, possibilitando atribuir funções biológicas, além de obter conhecimento sobre possíveis padrões de expressão, compreender mecanismos de resistência, avaliar a capacidade antigênica, e conseqüentemente, permitir identificar novos alvos marcadores, sejam eles vacinais, terapêuticos, diagnósticos ou prognósticos (COELHO et al., 2012; FAKHRY; QUELLETE; PAPADOPOULOU, 2002).

Muitas são as proteínas já descritas e estudadas até o presente momento dentro do proteoma de *Leishmania*, desde proteínas já bem definidas quanto sua atividade, bem como proteínas hipotéticas que pouco se sabe sobre suas funções biológicas. Sobretudo, alguns desses antígenos, quando avaliados como proteínas recombinantes individuais, têm demonstrado um elevado potencial antigênico. Um estudo imunoproteômico demonstrou tal atividade em algumas proteínas, nomeadas posteriormente de LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP, que foram identificadas em extratos proteicos de *L. infantum* em estágios promastigotas e amastigota, e demonstraram reatividade frente a soros de cães assintomáticos e sintomáticos para LV (COELHO et al., 2012). Em outros estudos, alguns destes antígenos por meio da presença de epítomos de linfócitos T e B, também demonstraram em suas formas recombinantes uma importante capacidade antigênica contra LV canina e humana, o que indica uma possível ação diagnóstica satisfatória

contra as leishmanioses (COELHO et al., 2012; FAKHRY; QUELLETE; PAPADOPOULOU, 2002; LAGE et al., 2016a; MARTINS et al., 2015; PORTELA et al., 2018).

Quanto aos potenciais individuais dessas proteínas, a proteína nomeada LiHyT por exemplo, é uma proteína hipotética de *L. infantum*, que foi identificada por meio de imunoproteômica a partir de soros de cães com LV sintomática. Essa proteína foi encontrada em estágio promastigota de fase estacionária do parasito *Leishmania*, sendo que também demonstrou capacidade de conferir proteção em camundongos BALB/c desafiados com *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis*, sendo um importante candidato vacinal para LV e LT (COELHO et al., 2012; MARTINS et al., 2016a, 2016b). Em outro estudo, avaliou-se também a proteína hipotética LiHyD, uma proteína bem conservada nas principais espécies de *Leishmania*, como *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, e não foi encontrada até o momento nenhuma reatividade ou possível homologia com tripanossomatídeos, ou ainda outras espécies com possíveis reações cruzadas (LAGE et al., 2016b). Além de apresentar possíveis respostas de células T e B, tal proteína também foi considerada um importante marcador diagnóstico em sua forma recombinante frente a soros de cães infectados com LV, assim como demonstrou ser um potencial alvo imunológico na formulação de novas vacinas para LV e LT (LAGE et al., 2015, 2016a, 2016b). Ambas as proteínas hipotéticas, LiHyD e LiHyT, demonstraram em um mesmo estudo, uma elevada reatividade frente a soros de pacientes LV positivos, não demonstrando reatividade quando avaliadas frente a soros de pacientes com doenças de Chagas, hanseníase e aspergilose (PORTELA et al., 2018). Além disso, essas proteínas apresentaram potencial prognóstico, visto que quando avaliadas com soros de pacientes já tratados de LV, foram capazes de detectar pacientes após uma possível cura clínica (PORTELA et al., 2018).

As demais proteínas hipotéticas, como LiHyV e LiHyP, também foram reconhecidas por anticorpos de soros de cães com LV e foram sugeridas como potenciais marcadores diagnósticos em estudo anterior (COELHO et al., 2012). As proteínas LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP demonstram ser bem conservadas nas principais espécies de *Leishmania*. Dentre as quatro proteínas hipotéticas, LiHyV e LiHyP ainda necessitam de mais estudos que permitam avaliar suas funções biológicas, assim como suas possíveis aplicabilidades no controle das leishmanioses. Até o presente momento, nenhum desses antígenos foi testado frente a soros de LTH, e/ou em diferentes abordagens, como aplicados no desenvolvimento de proteínas quimeras utilizando porções específicas previamente selecionadas destes antígenos, a fim de testar sua reatividade frente a LTH e LV/HIV. Diante deste cenário, torna-se ainda mais necessário o estudo baseado em alvos como estes, que apresentem bom potencial, visando o desenvolvimento de

novas tecnologias diagnósticas que sejam viáveis em sua aplicação e que permitam uma detecção ampla, com eficácia suficiente e elevada precisão diagnóstica frente a estas doenças.

### 3.10 Bioinformática no desenvolvimento de novos marcadores diagnósticos

A aplicação de abordagens computacionais por meio de análises em programas de bioinformática tem sido realizada tanto para rastrear alvos biológicos no tratamento das leishmanioses, como para identificar marcadores imunogênicos importantes no desenvolvimento de vacinas e marcadores diagnósticos. Sobretudo, o uso de ferramentas na tecnologia genômica, imunoproteômica e proteômica, têm se tornado cada vez mais frequente nesse espectro de busca por novos diagnósticos e produção de novos imunógenos (DUARTE et al., 2017; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2018).

Com o auxílio de programas de bioinformática disponíveis gratuitamente, é possível aplicar inúmeras estratégias em proteínas de diversos patógenos, como é caso de *Leishmania*. Uma das possibilidades é a busca por novos antígenos compostos por epítomos específicos de células B. O desenvolvimento destes antígenos tende a apresentar menor custo, maior praticidade e aplicabilidade, além de índices adequados de sensibilidade e especificidade, quando comparados aos métodos convencionais atualmente aplicados (FERNANDES et al., 2012; GARCIA et al., 2021; VALE et al., 2022).

Mediante a uma variedade de ferramentas de bioinformática, é possível que dados de biologia estrutural e biologia ômicas, sejam disponibilizados e organizados em bancos de dados atualmente disponíveis, permitindo facilitar cada vez mais o estudo de diversas DTN, tornando-se essenciais no desenvolvimento de novos biomarcadores voltados diretamente ao controle das leishmanioses (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2018). Através de programas preditores de regiões em uma sequência proteica com possíveis respostas de linfócitos B, é possível prever e selecionar epítomos que estejam distribuídos em diferentes locais de uma determinada proteína alvo. Estas ferramentas de bioinformática permitem definir sequências específicas dentro de uma proteína alvo, encontrar epítomos acessíveis, flexíveis, hidrofóbicos e com provável resposta do tipo B, obtendo ainda características físico-químicas de diferentes peptídeos selecionados e detectar, com alta precisão, possíveis interações antígeno-anticorpo. Todas essas características que são necessárias para o desenvolvimento de novos produtos diagnósticos mais específicos, sensíveis e de fácil aplicação (KOZLOVA et al., 2015; MENDES et al., 2013; MOREAU et al., 2008).

Nesse contexto, tendo em vista que a aplicação eficaz de testes diagnósticos voltados para a detecção das leishmanioses e coinfeção LV/HIV são ainda de fato um grande desafio, e considerando as limitações existentes diante de suas aplicações, a construção de proteínas quiméricas a partir da predição de epítomos de células B por bioinformática e sua utilização em testes sorodiológicos, pode facilitar as condições do diagnóstico dessas doenças. O princípio dessas novas moléculas consiste na união de diferentes fragmentos peptídicos originando uma nova proteína sintética (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2013; FERNÁNDEZ-ROBLEDO; VASTA, 2010). De modo geral, os epítomos presentes na proteína quimérica, se mantem acessíveis frente às células imunes dos hospedeiros, além de apresentarem boa estabilidade (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2013; LAGE et al., 2016b).

Estudos voltados ao desenvolvimento de proteínas quimeras e predição de novos epítomos vêm crescendo, visando melhores desempenhos na aplicação diagnóstica para diversas doenças infecciosas além das leishmanioses, como por exemplo, Doenças de Chagas, hanseníase, COVID-19, entre outras (DIAS et al., 2023; MACHADO et al., 2023; SCUSSEL et al., 2022; SOARES et al., 2021).

Algumas proteínas de *Leishmania*, como K39, A2, HSP83, LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP, entre outras proteínas hipotéticas vêm sendo também estudadas como antígenos recombinantes para o sorodiológico (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016; KARIMI KAKH et al., 2020; LAGE et al., 2016a; RIBEIRO et al., 2018; VALE et al., 2022). No entanto, não se avaliou a combinação de alguns destes antígenos sendo as proteínas LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP, assim como peptídeos individuais provenientes destas proteínas, quanto ao potencial frente a amostras de diferentes leishmanioses, coinfeção LV/HIV e possível marcador prognóstico, tornando-se promissor o desenvolvimento de antígenos que possam detectar com sensibilidade e especificidade as inúmeras possibilidades de infecção, provocadas pelo parasito do gênero *Leishmania*. Estudos anteriores, já sugerem que a combinação de antígenos distintos em um único produto, possa potencializar a eficácia diagnóstica, permitindo detectar a variabilidade de resposta imune provocada pelos pacientes (VALE et al., 2022).

Dessa forma, no presente trabalho, as sequências de aminoácidos de quatro proteínas antigênicas do parasito *L. infantum*, identificadas anteriormente em um estudo imunoproteômico, sendo elas LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP, foram avaliadas para a predição de epítomos lineares de células B, e uma nova proteína quimérica foi construída a partir da união desses peptídeos (COELHO et al., 2012). A versão recombinante da proteína, bem como os epítomos que deram origem a ela, sob a forma de peptídeos, foram testados como ferramentas de sorodiológicos para detecção da leishmaniose tegumentar, visceral e coinfeção LV/HIV, bem como

a ação prognóstica para avaliação da distinção sorológica de pacientes com a doença ativa daqueles tratados e curados.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma proteína quimérica recombinante composta por epítomos lineares específicos de células B de proteínas antigênicas de *Leishmania infantum* e avaliar seu potencial diagnóstico, assim como dos peptídeos individuais que a compõem, frente às leishmanioses tegumentar e visceral, bem como na coinfeção com HIV; além de testá-la como marcador prognóstico após o tratamento das doenças.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a predição de epítomos específicos de células B humanas nas proteínas selecionadas.
- Sintetizar os epítomos preditos.
- Desenhar, sintetizar e avaliar características físico-químicas da proteína quimérica, a partir dos epítomos preditos.
- Realizar a expressão e purificação da proteína quimérica.
- Avaliar o potencial diagnóstico dos antígenos produzidos (quimera e peptídeos) por ELISA frente a amostras de soros de indivíduos não-infectados residentes em áreas endêmica e não endêmica da doença, bem como pacientes com LV, LT, LV/HIV, HIV, Doença de Chagas, hanseníase, histoplasmose, aspergilose, tuberculose e malária.
- Avaliar o potencial prognóstico dos antígenos produzidos (quimera e peptídeos) frente a amostras de soros de pacientes antes e seis meses após o tratamento das leishmanioses.
- Avaliar parâmetros de sensibilidade e especificidade a fim de definir o melhor antígeno a ser definido como marcador eficaz no sorodiagnóstico de LV, LT e coinfeção LV/HIV.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), com o número de protocolo CAAE- 32343114.9.0000.5149. Todas as etapas do trabalho realizadas seguiram de acordo com os princípios éticos da Declaração de Helsinque e todos os pacientes receberam uma cópia individual da política do estudo, que foi revisada por uma pessoa responsável. Obteve-se um consentimento por escrito de todos os pacientes.

### 5.2 Parasitos

Para a realização do cultivo dos parasitos, utilizamos a cepa (MHOM/BR/1970/BH46) de *L. infantum* e a cepa (MHOM/BR/1975/M2904) de *L. braziliensis*. As formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram cultivadas em meio Schneider's (Schneider's Insect Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB, Sigma), 20 mM de L-glutamina, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4. Os parasitos foram cultivados a 24°C e os repiques das culturas foram efetuados de cinco em cinco dias (período em que os parasitos se apresentavam em fase logarítmica de crescimento). Estoques de parasitos foram mantidos em nitrogênio líquido.

### 5.3 Preparo do extrato antigênico de *L. infantum* e *L. braziliensis*

O extrato antigênico solúvel de *Leishmania* (SLA) foi preparado a partir de 10<sup>9</sup> promastigotas estacionárias, as quais foram cultivadas em meio Schneider's completo. As promastigotas estacionárias foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS 1x pH 7,4) e então submetidos a seis ciclos alternados de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho-maria, respectivamente (COELHO et al., 2003). O material foi rompido por sonicação usando um processador ultrassônico (modelo GEX600), com cinco ciclos de 30 segundos a 38 MHz. O lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min a 4°C e o sobrenadante contendo SLA foi coletado e armazenado a -70°C até o uso (COELHO et al., 2003). O conteúdo de proteína foi estimado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### 5.4 Amostras de soros humanos utilizados para estudo de LV e coinfeção LV/HIV

Para a realização dos ensaios de ELISA aplicando os antígenos na avaliação de potencial diagnóstico para LV e coinfeção LV/HIV, foram utilizadas amostras de soro de pacientes com LV (n = 45, sendo 28 homens e 17 mulheres, com idades entre 27 e 64 anos), coinfeção LV/HIV (n = 25, sendo 17 homens e 8 mulheres com idades entre 31 e 55 anos) e infectados por HIV (n = 20; sendo 13 homens e 7 mulheres com idades entre 22 e 50 anos). A infecção por *Leishmania* foi confirmada pela identificação do kDNA *L. infantum* em aspirados de baço ou medula óssea dos pacientes pela técnica de PCR (COTA et al., 2013). O diagnóstico de HIV foi feito por avaliação clínica e pela contagem de células T CD4+ e carga viral dos pacientes. Dentre os pacientes envolvidos na pesquisa, nenhum deles recebeu qualquer tipo de tratamento antes da coleta das amostras para o estudo. Além disso, amostras de indivíduos saudáveis residentes em região endêmica da doença que não apresentaram sinal de infecção para LV (n = 45, sendo 26 homens e 19 mulheres com idades entre 23 e 57 anos de Belo Horizonte), estes pacientes não apresentavam nenhum sinal clínico ou possível suspeita de leishmaniose, além de possuírem teste sorológico negativo testado por kit comercial (Kalazar Detect™ Test, InBios International, Inc., Seattle, WA, EUA). Também foram utilizadas amostras de pacientes com Doença de Chagas (n = 40, sendo 26 homens e 14 mulheres com idades entre 27 e 52 anos), tuberculose (n = 10, sendo 6 homens e 4 mulheres com idades entre 27 e 57 anos) e malária (n = 10, sendo 7 homens e 3 mulheres com idades entre 35 e 64 anos).

#### 5.5 Amostras de soros humanos utilizados para avaliação dos antígenos frente LT

Para a realização dos ensaios de ELISA aplicando os antígenos na avaliação de potencial diagnóstico para LT, foram utilizadas amostras de soro de pacientes com LC (n = 25; incluindo 15 homens e 10 mulheres, com idades variando de 27 a 56 anos) e LM (n = 30; incluindo 18 homens e 12 mulheres, com idades variando de 29 a 63 anos), todos residentes em área endêmica de LT (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). O diagnóstico foi confirmado por meio de exames clínicos e parasitológicos para detecção de parasitos por esfregaços corados com Giemsa de lesão e/ou fragmentos de mucosa, bem como pela identificação do conteúdo parasitário pela técnica de PCR (SANTOS et al., 2019).

Os pacientes com LC apresentaram um tempo presumido de evolução da doença variando de 4 meses a 8 anos, enquanto os pacientes com LM apresentaram um tempo presumido de evolução da doença variando de 6 meses a 12 anos. Nenhum dos pacientes LT foi submetido

a qualquer tratamento antes da coleta da amostra. Também foram coletados soros de indivíduos saudáveis residentes em região endêmica da doença (n = 25, incluindo 14 homens e 11 mulheres, com idades variando de 26 a 42 anos; Belo Horizonte). Esses indivíduos não apresentavam sinais clínicos de leishmaniose. Também avaliamos amostras de pacientes com Doença de Chagas (n = 25, incluindo 16 homens e 9 mulheres, com idades variando de 33 a 59 anos), que foram diagnosticados por hemocultura, kit ELISA recombinante Chagatest® v.4.0 e/ou inibição da hemaglutinação Chagatest® (Wiener lab., Rosario, Argentina), bem como de pacientes com hanseníase (n = 20, sendo 12 homens e 8 mulheres, com idades variando de 35 a 55 anos), aspergilose (n = 15, incluindo 8 homens e 7 mulheres, com idades variando de 34 a 60 anos) e histoplasmoze (n = 15; incluindo 6 homens e 9 mulheres, com idades variando de 30 a 56 anos). O diagnóstico dessas doenças foi confirmado por meio do teste rápido ML Flow, detecção de hifas fúngicas no exame histopatológico e isolamento do fungo em cultura de lavado broncoalveolar e/ou sangue total, respectivamente. Além disso, soros de pacientes infectados pelo HIV (n = 15, incluindo 9 homens e 6 mulheres, com idades variando de 28 a 50 anos), diagnosticados por meio de exame clínico e exames laboratoriais para contagem de células T CD4 + e determinação de a carga viral, também foram utilizados.

#### 5.6 Amostras de pacientes após o tratamento

Foram coletadas amostras de soro de pacientes com LV (n = 6, sendo 4 homens e 2 mulheres, com idades entre 33 e 61 anos) e pacientes com LM (n = 15) antes e seis meses após o tratamento, quando a resposta humoral específica a proteína quimera, e SLA foram avaliados. Os pacientes foram submetidos ao tratamento com antimoniais pentavalentes (Sb<sup>+5</sup>) (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brasil), na dose de 20 mg Sb<sup>+5</sup>/kg e durante 30 dias. Nenhum deles sofria de qualquer outra infecção ou doença pré-existente. Após o término do tratamento, todos os pacientes estavam livres de qualquer sinal de leishmaniose e foram classificados como clinicamente curados.

#### 5.7 Seleção das proteínas

Para selecionar os epítomos de células B específicos, utilizamos quatro proteínas avaliadas anteriormente em estudo imunoproteômico (COELHO et al., 2012). A fim de obter as sequências primárias de cada proteína, realizou-se uma busca utilizando o código de cada proteína no banco de dados online SwissProt ([web.expasy.org/docs/swiss\\_prot](http://web.expasy.org/docs/swiss_prot)), sendo LiHyT (XP\_001465138.1), LiHyD (XP\_001468360.1), LiHyV (XP\_001462854.1) e LiHyP

(XP\_001468385.2). Em seguida, utilizou-se o algoritmo de bioinformática Blast-p (protein-protein BLAST), pertencente ao programa BLAST, para avaliar a similaridade das proteínas com as demais proteínas depositadas no banco de dados (ALTSCHUL et al., 1990). Para isso, colocou-se a sequência de aminoácidos de cada proteína candidata e o parâmetro *non-redundant protein sequences*, obtendo-se então as proteínas com maior similaridade. Após a busca, avaliou-se individualmente a similaridade de cada proteína candidata com as proteínas de *Leishmania* e *Trypanosoma spp.* que poderiam causar reatividade cruzada, repetiu-se o processo para cada proteína.

### 5.8 Predição de epítomos específicos de células B

As sequências das proteínas selecionadas foram submetidas ao programa ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), o qual é capaz de prever epítomos lineares de células B baseando-se em padrões de comprimento fixo através de uma rede neural artificial (SAHA; RAGHAVA, 2006). Neste programa, utilizou-se os seguintes parâmetros: *Threshold: 0.85; Window length used for prediction: 16; Overlapping filter: ON*. Realizou-se, então, a predição dos possíveis epítomos para cada uma das quatro proteínas selecionadas. Ao prever os possíveis epítomos das proteínas pelo ABCpred, as sequências proteicas foram alinhadas através do programa Clustal Ômega, programa que permite realizar o alinhamento de múltiplas sequências. Sendo assim, cada proteína candidata foi alinhada com as proteínas obtidas pelo programa BLAST e tiveram os epítomos preditos e identificados na sequência proteica. Assim, foi possível verificar a similaridade dos epítomos preditos com outras proteínas do mesmo gênero e com proteínas dos gêneros responsáveis por possíveis reações cruzadas. Desta forma, os epítomos que se mostraram similares às proteínas do gênero de *Leishmania* e não similares aos demais gêneros, foram selecionados.

Para confirmação da predição dos possíveis epítomos, utilizou-se o programa de bioinformática IEDB ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)), descrito por (1985). Aplicou-se o algoritmo Emini Surface *Accessibility Prediction*, que permite identificar na sequência da proteína os resíduos de aminoácidos mais acessíveis, sendo estes aminoácidos possivelmente reconhecidos por anticorpos (EMINI et al., 1985). Foram então utilizados os parâmetros com valores de *Window size: 12* e *Threshold: 1.0*. Dessa forma, foram selecionados dois epítomos de cada uma das proteínas candidatas e as sequências de aminoácidos selecionadas foram destacadas na estrutura da proteína, e aquelas consideradas positivas em ambas as análises foram consideradas como bons epítomos e utilizados como peptídeos alvo de cada proteína.

### 5.9 Construção, caracterização e síntese da proteína quimérica

Para o desenho da proteína quimérica foram utilizados os epítomos preditos conforme descrito no item anterior. A disposição de cada um dos epítomos dentro da proteína quimérica foi escolhida de forma a mimetizar a disposição desses em sua proteína de origem. Após, com o objetivo de proporcionar flexibilidade e evitar a sobreposição espacial entre os epítomos na sequência da proteína, dois resíduos de glicina foram incluídos entre cada sequência peptídica (MENDES et al., 2013). As sequências de aminoácidos de cada epítomo foram traduzidas para sequência de códons de DNA correspondente, utilizando o Mapa do Código Genético Padrão (STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2004). Para avaliar a solubilidade da proteína quimérica, foi utilizado o servidor PepCalc ([www.pepcalc.com](http://www.pepcalc.com)). Além disso, utilizamos a ferramenta ProtParam, pertencente ao ExPasy, para avaliar parâmetros físicos e químicos, incluindo cálculos de meia-vida estimada, índice de instabilidade, índice alifático, massa molecular e ponto isoeletrico (GASTEIGER et al., 2005). Após a construção da proteína quimérica, a sequência de códons foi encaminhada para síntese da molécula de DNA, no qual o gene codificador da proteína quimérica foi inserido no vetor pET28a-TEV e sintetizado comercialmente pela empresa Genscript® (USA).

### 5.10 Expressão e purificação da proteína quimérica

Para a expressão da proteína quimérica, as bactérias *E. coli* Arctic Express foram transformadas pela adição do vetor pET-28<sup>a</sup>-TEV que continha a sequência do gene codificante da proteína de interesse. Após a transformação, as bactérias foram adicionadas em placas contendo meio LB, acrescido de canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL) para verificar o aparecimento de colônias positivas. Algumas colônias positivas foram escolhidas para a realização de uma expressão piloto com o intuito de avaliar as melhores condições de expressão da proteína. Após este teste, um pré - inóculo foi preparado para realizar a expressão em maior escala. O glicerinado da colônia escolhida foi, então, transferido para um Erlenmeyer contendo 20 mL de meio LB, adicionado de canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL) e deixado em incubação em agitador tipo *shaker* a 200 rpm, por 18 h e a 12°C. No dia seguinte, para a indução da expressão da proteína, os 20 mL da cultura foram adicionados a um Erlenmeyer contendo 2 litros de meio LB, acrescido de canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL). A cultura foi deixada em incubação durante 2 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm, até que a densidade óptica (OD<sub>600</sub>) da mesma atingisse absorvância entre 0,4 e 0,6. Em seguida, uma alíquota de 1

mL foi removida, sendo correspondente à cultura sem indução. Posteriormente, para induzir a expressão da proteína quimérica, foi adicionado 1,0 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranoside) (Promega®, Canadá), por 2 h a 37 °C. A cultura foi mantida em incubação em agitador tipo *shaker* a 200 rpm, durante 4 horas a 12 °C. Após a expressão, a cultura foi centrifugada a 5100 rpm durante 10 minutos a 4°C, tendo seus *pellets* congelados, em seguida, interrompidas com seis ciclos de congelamento e descongelamento, seguidos por seis ciclos de ultrassom com ciclos de 30 s cada (36 MHz). Em sequência, a proteína foi purificada em uma coluna de afinidade HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences, NJ, EUA). Os *pellets* obtidos na centrifugação foram lisados e centrifugados novamente para eliminar as membranas da bactéria ainda presentes, e então, 1 mL de resina (Agarose Ni-NTA) foi adicionado na amostra e mantidos sob agitação durante 1 hora. Em seguida, a resina e a amostra foram inseridas na coluna, realizando a coleta do *Flow Through* (FT). Após, 5 mL de tampão de lavagem foi adicionado por duas vezes, para retirada do excesso de impurezas. Por fim, as frações foram eluídas em tampão de eluição, coletadas e concentradas em filtros Amicon® ultra15 com um limite de peso molecular nominal de 10.000 (NMWL, Millipore, Alemanha). Uma alíquota de 1 mL foi retirada após cada etapa da purificação para posterior análise em gel de poliacrilamida. Após a diálise, a proteína quimérica (19,2 kDa) foi passada por uma coluna de polimixina-agarose (Sigma-Aldrich, EUA) para remover qualquer conteúdo de endotoxina residual (kit Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Assay QCL-1000, BioWhittaker, MD, EUA).

### 5.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Um gel SDS-PAGE 12% foi realizado para avaliar a pureza e qualidade da proteína quimérica. As amostras obtidas nos ensaios de expressão e purificação foram submetidas à separação por eletroforese em géis desnaturantes (SDS-PAGE 12%) em sistema de eletroforese vertical, Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad). O gel de separação foi preparado utilizando as soluções Bis-acrilamida 40%, diluída a 12% v/v e 1,5 M de Tris-HCl pH 8.8, 0,4% de SDS. A polimerização do gel ocorreu com a adição de 0,5% (v/v) de persulfato de amônio e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante aos de separação, porém a 4% de Bis-acrilamida e com solução 0,5 M de Tris-HCl, pH 6.8. As amostras foram diluídas na proporção de 5:1 em tampão de amostra 6x concentrado (125 mM Tris hidroximetil aminometano, SDS 2% v/v, azul de bromofenol, glicerol P.A. 60% v/v e  $\beta$ -mercaptoetanol 10% v/v). As amostras com tampão foram aquecidas a 100 °C durante 5 minutos para a desnaturação das proteínas e, posteriormente, aplicadas no gel para a separação

eletroforética. Um padrão de peso molecular (PageRuler Prestained Ladder, Thermo Scientific) foi utilizado para facilitar a identificação da proteína de interesse. A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e água destilada q.s.p.), sob à voltagem de 70 Volts até que as amostras entrassem no gel separador e, em seguida, a 150 Volts. Após a corrida, o gel foi incubado com solução corante Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% p/v, Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1% p/v, Metanol 50% v/v, Ácido acético 10% v/v e água destilada) e, em seguida, descorados por lavagens sucessivas em solução descorante (ácido acético 10%, metanol 30% e água destilada 60%), possibilitando a visualização das bandas proteicas no gel.

### 5.12 Immunoblotting

Para a realização dos *immunoblotting*, um gel SDS-PAGE 12% foi preparado e nele foram aplicadas 10 µg da proteína quimérica juntamente com padrão de baixo peso molecular (Invitrogen™, Life Technologies, EUA). Após a corrida eletroforética, a proteína foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (0,2 µm de tamanho de poro, Sigma-Aldrich, EUA), sob corrente constante 80 mA, em temperatura de 4°C, por 2 horas. Posteriormente, a membrana foi bloqueada *overnight* sob agitação com PBS-T 5% (v / v) de BSA 1%. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por duas vezes com PBS-T 5%, por 10 minutos e submetida à incubação com os *pools* de soro dos pacientes com LV (n = 5) e indivíduos saudáveis (n = 4), avaliamos também um pool de pacientes com LC e LM (n = 4 cada), todos diluídos 1:100 em PBS-T 5%, por 1 h sob agitação a 37°C. As membranas foram novamente lavadas duas vezes com PBS-T 5%, por 10 minutos e incubadas com uma solução de anticorpo IgG anti-humano conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich, EUA) diluído 1:10000 em PBS-T 5% durante 1 h a 37 °C. As revelações das bandas ocorreram pela adição de cloronaftol, diaminobenzidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 min, sendo interrompidas com água destilada. Um anticorpo monoclonal 6-HIS Tag (catálogo MA1-21315; Thermo Fisher Scientific, EUA) foi utilizado como controle de proteína. Foi utilizado um padrão de escada de proteína de gama baixa (Invitrogen™, Life Technologies, EUA). Três experimentos independentes foram realizados e os resultados foram semelhantes.



### 5.13 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos preditos foram sintetizados utilizando a técnica química de Fmoc-*Synthesis* descrita por Merrifield (1969) e adaptada por Machado-de-Ávila et al. (MACHADO DE AVILA et al., 2011). O método consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel (resina) e alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Para isso, é feita a desproteção do grupamento Fmoc (Fluorenil-metiloxicarbonila) com 4-metil-piperidina 25% em dimetilformamida (DMF), lavagem com DMFDCM (diclorometano), MeOH (metanol), teste azul de bromofenol, para verificar a desproteção, ligação do aminoácido, e realizado teste de azul de bromofenol para verificar o acoplamento do aminoácido. Estas etapas são realizadas em ciclo até a ligação do último aminoácido da sequência. Ao final os grupamentos protetores da cadeia lateral são eliminados e o peptídeo é removido da resina através da solução de clivagem contendo 25  $\mu$ L (25%) de água ultrapura (milli-Q), 25  $\mu$ L (25%) de TES (trietilsilano), 925  $\mu$ L (95%) de TFA (ácido trifluoracético). Esta solução é incubada por 3 horas na seringa, logo após, adiciona-se éter etílico gelado ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) e incubado *overnight*. No dia seguinte, centrifuga-se a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos a 10000 rpm, adiciona-se éter etílico ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) novamente e a centrifugação é repetida. Retira-se novamente o éter etílico, e o material obtido é liofilizado.

### 5.14 ELISA utilizando os antígenos

Curvas de titulação foram realizadas para determinar as concentrações dos antígenos e a diluição dos anticorpos primários e secundários a serem utilizados. Placas de imunoensaio com 96 poços (Jetbiofil®, Belo Horizonte) foram sensibilizadas com SLA *L. infantum* quando para comparação na avaliação de amostras com LV onde utilizou-se (1,0  $\mu\text{g/poço}$ ), SLA *L. braziliensis* quando para comparação na avaliação das amostras de LT sendo (2,0  $\mu\text{g/poço}$ ), e os demais antígenos que foram desenvolvidos, sendo a proteína quimérica e os oito peptídeos em concentrações de 0,250 e 5,0  $\mu\text{g/poço}$ , respectivamente, ambos diluídos em 100  $\mu\text{L}$  de tampão de sensibilização (carbonato de sódio 50 Mm, pH 9.6) e incubados por 16 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a sensibilização, foi realizado o bloqueio com 250  $\mu\text{L}$  de solução contendo PBS-T 0,05% contendo 5% de albumina bovina (*Bovine serum albumin*, BSA) por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes utilizando e PBS 1x 0,05% Tween 20 (PBS-T) e feita a incubação com 100  $\mu\text{L}$  de soros humanos por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . As amostras de soros foram diluídas previamente a 1:100 para os peptídeos e SLA e 1:200 para a proteína quimera em PBS-T contendo 0,5% de solução BSA. As placas foram lavadas 7 vezes utilizando PBS-T e,

posteriormente, incubadas durante 1 h a 37 °C com 100 µL de anticorpo conjugado com peroxidase anti-IgG humano (Sigma, St. Louis, USA), diluído em PBS – T 0,5% de BSA. Foi utilizada a diluição de 1:10.000 para os testes com os peptídeos, e de 1:20.000, para os ensaios com a proteína quimérica. Novamente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e feita a revelação com a adição de 100 µL/poço da solução reveladora composta por 10 mL de tampão citrato-fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05M e ácido cítrico 0,03 M q.s.p. 1 L de água destilada, pH 5.0), 2 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) e 4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As placas foram incubadas à temperatura ambiente sob abrigo de luz por 30 min, quando a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Os valores de densidade óptica (DO) foram obtidos em um leitor de microplacas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá), com leitura em comprimento de onda de 492 nm. As amostras foram utilizadas no mesmo dia com os mesmos reagentes (lotes, diluições etc.), para reduzir qualquer variação experimental e interferência na interpretação dos dados. Por fim, também avaliamos a reatividade humoral, esta que foi analisada usando amostras de pacientes com LV e coinfectados com LV/HIV contra um kit comercial (Kalazar Detect™ Test), que foi usado de acordo com as instruções do fabricante (InBios International, EUA).

### 5.15 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram avaliados no programa GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows). Os valores de corte para a validação da sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sobre a curva (AUC), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança (RV) e índice de Youden (Y) - [(sensibilidade + especificidade) – 1] dos antígenos foram determinados após a construção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para avaliar o desempenho dos antígenos. Utilizou-se um intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e o ponto de corte foi determinado pela média das amostras negativas mais dois desvios padrão. O teste ANOVA, seguido pelo *pos-test* de Bonferroni foram empregados para as avaliações comparativas entre os diferentes grupos, sendo consideradas significativas as diferenças com valor de  $P < 0.05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seções de resultados e discussão desta tese, serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos publicados, seguindo conforme as normas gerais que regem o Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, UFMG (Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013), no qual permitem tal apresentação na redação de dissertações e teses.

### 6.1 Artigo 1 – Breve introdução e objetivos

O primeiro artigo a ser apresentado foi intitulado “**ChimLeish, uma nova proteína quimérica recombinante avaliada como marcador diagnóstico e prognóstico para leishmaniose visceral e coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana**”, publicado na revista internacional *Parasitology Research*. Ano de publicação 2021 – Fator de impacto de 2.383. DOI: 10.1007/s00436-021-07342-1.

Baseado nas limitações enfrentadas no diagnóstico de leishmaniose, onde os testes imunológicos amplamente utilizados apresentam baixa sensibilidade e especificidade em pacientes infectados e coinfectados por LV/HIV, além de demonstrarem elevada reatividade cruzada com outras doenças endêmicas, como doença de chagas, malária e tuberculose. Este primeiro estudo, apontou como hipótese, que uma combinação de antígenos distintos poderia reduzir a heterogeneidade na detecção das respostas imunes individuais dos pacientes e levar a uma melhor sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de LV e coinfeção LV/HIV.

Frente a este cenário, tal estudo teve como objetivo principal realizar a predição de epítopos específicos de células B encontrados a partir de quatro proteínas de *L. infantum*, denominadas LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP, que demonstraram anteriormente potencial antigênico em soros de LV canina e/ou humana (COELHO et al., 2012; LAGE et al., 2016b; MARTINS et al., 2015; PORTELA et al., 2018). A partir destes epítopos construir uma proteína quimérica recombinante, a fim de examinar seu potencial diagnóstico frente a LV e coinfeção LV/HIV. Além, de avaliar a atividade prognóstica dos antígenos neste estudo desenvolvidos, investigando-os em amostras de soro de pacientes com LV coletadas antes e após seis meses do tratamento para leishmaniose.



## ChimLeish, a new recombinant chimeric protein evaluated as a diagnostic and prognostic marker for visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus coinfection

Nathalia C. Galvani<sup>1</sup> · Amanda S. Machado<sup>1</sup> · Daniela P. Lage<sup>1</sup> · Camila S. Freitas<sup>1</sup> · Danniele L. Vale<sup>1</sup> · Daysiane de Oliveira<sup>2</sup> · Fernanda Ludolf<sup>1</sup> · Fernanda F. Ramos<sup>1</sup> · Bruna B. Fernandes<sup>2</sup> · Gabriel P. Luiz<sup>2</sup> · Débora V. C. Mendonça<sup>1</sup> · João A. Oliveira-da-Silva<sup>1</sup> · Thiago A. R. Reis<sup>1</sup> · Grasielle S. V. Tavares<sup>1</sup> · Ana T. Chaves<sup>1</sup> · Nathalia S. Guimarães<sup>1</sup> · Unai Tupinambás<sup>1</sup> · Gláucia F. Cota<sup>3</sup> · Maria V. Humbert<sup>4</sup> · Vívian T. Martins<sup>1</sup> · Myron Christodoulides<sup>4</sup> · Eduardo A. F. Coelho<sup>1,5</sup> · Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>2</sup>

Received: 14 May 2021 / Accepted: 4 October 2021 / Published online: 19 October 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

### Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected tropical disease of global importance caused by parasites of the genus *Leishmania*, and coinfection with human immunodeficiency virus (HIV) is common in countries where both diseases are endemic. In particular, widely used immunological tests for VL diagnosis have impaired sensitivity (Se) and specificity (Sp) in VL/HIV coinfecting patients and there is also cross-reactivity with other endemic diseases, e.g., Chagas disease, malaria, and tuberculosis. To develop new antigens to improve the diagnosis of VL and VL/HIV coinfection, we predicted eight specific B-cell epitopes of four *Leishmania infantum* antigens and constructed a recombinant polypeptide chimera antigen called ChimLeish. A serological panel of 195 serum samples was used to compare the diagnostic capabilities of ChimLeish alongside the individual synthetic peptides. ChimLeish reacted with sera from all VL and VL/HIV coinfecting patients [Se = 100%; Sp = 100%; area under the curve (AUC) = 1.0]. Peptides showed lower reactivities (Se = 76.8 to 99.2%; Sp = 67.1 to 95.7%; AUC between 0.87 and 0.98) as did a *L. infantum* antigenic preparation used as an antigen control (Se = 56.8%; Sp = 69.5%; AUC = 0.45). Notably, ChimLeish demonstrated a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of anti-ChimLeish antibodies after treatment and cure of a small number of patients. Although only a limited serological panel was tested, preliminary data suggest that ChimLeish should be evaluated in larger sample studies for the diagnosis of VL and VL/HIV coinfection.

**Keywords** Visceral leishmaniasis · Recombinant chimera · Synthetic peptides · Diagnosis · Prognosis · ELISA

### Introduction

Leishmaniasis are tropical diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* that affect populations in several countries in the world (WHO, 2018). Infections range from

Section Editor: Sarah Hendrickx

Myron Christodoulides, Eduardo A. F. Coelho, and Ricardo A. Machado-de-Ávila are co-senior authors of this study.

✉ Eduardo A. F. Coelho  
eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

<sup>1</sup> Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina 88806-000, Brazil

<sup>3</sup> Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup> Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, Faculty of Medicine, University of Southampton, Southampton General Hospital, Southampton SO16 6YD, England, UK

<sup>5</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

self-limiting cutaneous lesions to fatal visceral, and the presentation depends on the species of the infecting parasite and the host's immunological response (Kevric et al. 2015; Okwor and Uzonna 2016). Visceral leishmaniasis (VL) can be fatal in about 95.0% of cases, when acute and if untreated (Torres-Guerrero et al. 2017). However, treatment is toxic and expensive and the emergence of resistant strains has been observed. Furthermore, no vaccine is available to protect against human VL (Srivastava et al. 2016; Ponte-Sucre et al. 2017).

Rapid and precise diagnosis of leishmaniasis is required, and parasitological tests have been used for this purpose, which have shown high specificity. However, variable sensitivity has been observed, since amastigote forms of the parasite or parasite antigens cannot be found in the collected organ aspirates, leading to false-negative results. Detection of the genetic material of the parasite by polymerase chain reaction (PCR) has improved the diagnosis of VL. PCR has higher sensitivity than the conventional parasitological methods and has been also used in epidemiological studies to detect the parasite in potential vectors and reservoirs (Pereira et al. 2014). However, the need of trained professionals, the high unit cost of PCR tests, and the need for sophisticated equipment, all hamper the large-scale use of this diagnostic technique in resource-limited settings in the least developed and low-to-middle income countries that bear the burden of infections (Srividya et al. 2012; Thakur et al. 2020).

Instead, immunological methods, such as the indirect immunofluorescence reaction (RIFI), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), direct agglutination test (DAT), immunochromatographic tests (ICTs), among others, have been used as diagnostic test platforms for VL (Sakkas et al. 2016; Mohebbali et al. 2020). In these tests, the use of recombinant proteins has improved the sensitivity and specificity of the diagnosis, and a kinesin-related protein called rK39 has been identified as a diagnostic antigen for VL in immunocompetent patients (Maia et al. 2012; Sanchez et al. 2020). rK39 has been used in ELISA assays to examine sera from patients with VL in India, and sensitivity and specificity values of 100% and 96.0% were reported, respectively (Mohapatra et al. 2010). In another study that examined sera from Brazilian patients, the rK39 antigen showed sensitivity and specificity values of 90.5% and 97.9%, respectively (Dhom-Lemos et al. 2019). Other recombinant antigens have been evaluated for diagnosis of VL. The amastigote-specific A2 protein was used in ELISA experiments and results showed 76.0–78.0% sensitivity to detect VL in Brazilian patients (Carvalho et al. 2002). Other kinesins, such as K9, K26, KE16, and KRP42, have also showed varying potential in diagnosing VL and their performance has varied depending on the study populations (Takagi et al. 2007; Mohapatra et al. 2010; Srividya et al. 2012). For example,

the performance of the rK39-based dipstick test to diagnose VL in patients from India, Nepal, and Brazil was high, but the test failed to detect the disease in Sudanese patients (Zijlstra et al. 2001; Singh et al. 2010). Thus, performance of such tests based on these recombinant antigens appears to be compromised by geography and the nature of the study populations.

Notably, coinfection with human immunodeficiency virus (HIV) has caused problems for the diagnosis of VL in patients living in countries where both diseases coexist and are endemic (Coutinho et al. 2017; Mohebbali and Yimam 2020). VL is an opportunistic disease in HIV-infected patients (Cipriano et al. 2017) and both pathologies contribute to worsening patient health. In coinfection cases, anti-*Leishmania* antibody levels are found in lower levels to those detected in immunocompetent patients, which reduces the sensitivity of the tests (Cota et al. 2012; Távora et al. 2015). In one study, the performance of distinct immunological tests was evaluated for the diagnosis of VL in Ethiopian patients, as well as those suspected to be infected with HIV. Results showed that sensitivity for VL ranged from 69.2 to 92.2%, whereas the specificity varied widely from 20.0 to 100%. The authors concluded that the sensitivity in the evaluated tests was reduced significantly when samples of VL/HIV coinfection patients were analyzed (Kassa et al. 2020).

Our hypothesis is that a combination of distinct antigens could reduce the heterogeneity of the patients' individual immune responses and leading to improved sensitivity and specificity for the diagnosis of VL and VL/HIV coinfection. Previously, we have shown that specific B-cell epitopes of four *L. infantum* proteins, called LiHyT, LiHyD, LiHyV, and LiHyP, were previously showed to be antigenic in canine and/or human VL (Coelho et al. 2012; Martins et al. 2015; Lage et al. 2016; Portela et al. 2018). In the present study, we constructed a recombinant chimeric protein called ChimLeish based on B-cell epitopes from these parasite proteins in order to examine its potential for the diagnosis of VL and VL/HIV coinfection. The efficacy of ChimLeish was evaluated using a serological panel from VL and VL/HIV patients, and its prognostic activity was investigated using sera samples from VL patients collected before and after treatment.

## Materials and methods

### Parasites

*L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) stationary promastigotes were grown in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 20% (v/v) inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, pH 7.4, at 24 °C.

The soluble *Leishmania* antigen extract (SLA) was prepared as described previously (Coelho et al. 2003), by growing  $10^9$  stationary promastigotes and disrupting them with six alternate cycles of freezing and thawing in liquid nitrogen and a water bath, respectively, followed by sonication with six cycles of 30 s at 38 MHz in an ultrasonic processor (GEX600 model). The lysate was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 15 min at 4 °C and the supernatant containing SLA was collected and stored at  $-70$  °C until use.

### Sera samples

The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) with protocol number CAAE-32343114.9.0000.5149. All patients received an individual copy of the study policy, which was reviewed by an independent person. Written consent was obtained from all patients. Sera were collected from VL ( $n = 45$ , including 28 males and 17 females, with ages ranging from 27 to 64 years), VL/HIV coinfecting ( $n = 25$ , including 17 males and 8 females, with ages ranging from 31 to 55 years), and HIV-infected ( $n = 20$ , including 13 males and 7 females, with ages ranging from 22 to 50 years) patients. The diagnosis of VL was confirmed by clinical evaluation and positive result for detection of *L. infantum* kDNA in spleen and/or bone marrow aspirates of the patients by PCR technique (Cota et al. 2013). HIV infection was based on clinical evaluation, CD4<sup>+</sup> T cell count and viral load in the patients. None of the patients was receiving any VL treatment before sample collection. Sera were also collected from healthy individuals living in an endemic region for VL ( $n = 45$ , including 26 males and 19 females, with ages ranging from 23 to 57 years; Belo Horizonte). They did not present with any clinical signs or suspicion of leishmaniasis and showed negative serological result using a commercial test (Kalazar Detect™ Test, InBios International, Inc., Seattle, WA, USA). In addition, sera samples from patients with Chagas disease ( $n = 40$ , including 26 males and 14 females, with ages ranging from 27 to 52 years), tuberculosis ( $n = 10$ , including 6 males and 4 females, with ages ranging from 27 to 57 years), and malaria ( $n = 10$ , including 7 males and 3 females, with ages ranging from 35 to 64 years) were used also in the ELISA experiments.

### Sera samples collected before and after VL treatment

Sera were also collected from VL patients ( $n = 6$ , including 4 males and 2 females, with ages ranging from 33 to 61 years), before and 6 months after treatment with pentavalent antimonials (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brazil). Patients received the same therapeutic

regimen of a dose of 20 mg Sb<sup>+5</sup> per kg for 30 days. None of the patients suffered from any other infection or had any pre-existing disease(s).

### Construction of ChimLeish protein

To select the specific B-cell epitopes of LiHyT (XP\_001465138.1), LiHyD (XP\_001468360.1), LiHyV (XP\_001462854.1), and LiHyP (XP\_001468385.2) proteins, their primary structure was evaluated using the SwissProt server ([web.expasy.org/docs/swiss-prot](http://web.expasy.org/docs/swiss-prot)), and their amino acid sequences were saved as .TXT files. The IEDB server ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)) was then used to identify the amino acid sequences most likely to be accessible, with the parameters of window size of 12 and a threshold of 1.0. The sequences identified were marked in the protein structure. The epitopes were predicted using the ABCpred ([www.imtech.res.in/raghava/abcpred/](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/)) server using the parameters of window size of 16 and a threshold of 0.85. The selected sequences were marked in the protein structure (Saha and Raghava 2006). The amino acids identified in both analyses were used to construct the target peptide sequence. The ProtParam server (Gasteiger et al. 2005) was used to obtain the physical-chemical characteristics of the chimera, while the PepCalc server ([www.pepcalc.com](http://www.pepcalc.com)) was used to evaluate the protein solubility.

### Production of the recombinant ChimLeish protein and peptides

The selected B-cell epitopes were used to construct the ChimLeish-encoding gene, which was cloned commercially into the pET28a-TEV vector (Genscript®, USA). The gene was inserted into *E. coli* Arctic Express (DE3) cells and protein expression was induced with 1.0 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Promega®, Canada), for 2 h at 37 °C. Cells were centrifuged at  $3,000 \times g$  for 10 min at 4 °C and disrupted using seven cycles of ultrasonication, with cycles of 30 s each (36 MHz), followed by six cycles of freezing and thawing. Cellular debris was removed after centrifugation ( $5,000 \times g$  for 15 min at 4 °C), and the recombinant protein was purified on a HisTrap HP affinity column (GE Healthcare Life Sciences, NJ, USA) connected to an AKTA system. The eluted fractions were concentrated using Amicon® ultra15 filters with nominal molecular weight limit of 10,000 (NMWL, Millipore, Germany), and then purified on a Superdex™ 200 gel filtration column (GE Healthcare, USA). After dialysis, ChimLeish was passed through a polymyxin-agarose column (Sigma-Aldrich, USA) in order to remove any residual endotoxin content (<10 ng of LPS per 1 mg of recombinant protein, measured by the Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Assay QCL-1000 kit, BioWhittaker, MD, USA). In

addition, the eight individual epitopes were synthesized by F-moc technique (Machado-de-Ávila et al. 2011). Briefly, peptides were released from the amine resin by trifluoroacetic acid treatment in the presence of the appropriate scavengers and diluted in milli-Q water. They were then purified by high-performance liquid chromatography on a C18 reverse phase column with flow rate 1.0 mL/min. The synthesized peptides were then submitted to a MALDI-TOF-TOF assay to evaluate their purity.

### Immunological assays

Titration curves were done to determine the most appropriate antigen concentration and antibody dilution to be used in the ELISA assays. Thus, microtiter immunoassay plates (Jetbiofil®, Belo Horizonte) were coated with the synthetic peptides, ChimLeish, and SLA (at 5.0, 0.250, and 1.0 µg per well, respectively) diluted in coating buffer (50 mM carbonate buffer, pH 9.6), and incubated for 16 h at 4 °C. Next, free binding sites were blocked with PBS-T (PBS plus 0.05% (v/v) Tween-20) added with 5% (w/v) bovine serum albumin for 1 h at 37 °C. Plates were washed five times with PBS-T and incubated with human sera (1:100 dilution in PBS-T for the peptides and SLA or 1/200 dilution in PBS-T for the ChimLeish) for 1 h at 37 °C. Plates were washed seven times in PBS-T and incubated with anti-human IgG peroxidase conjugated antibody (1/10,000 dilution in PBS-T for the peptides and SLA or 1/20,000 dilution in PBS-T for ChimLeish) for 1 h at 37 °C. Plates were then washed six times with PBS-T, and reactions were developed by incubation with a solution composed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ortho-phenylenediamine, and citrate-phosphate buffer pH 5.0, for 30 min in the dark. They were then stopped by addition of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the optical density (OD) values were read in an ELISA microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) at λ492 nm. All samples were tested on the same day and using the same reagents to reduce experimental variation. In addition, the humoral reactivity was analyzed using samples of VL and VL/HIV coinfecting patients against a

commercial kit (Kalazar Detect™ Test), which was used according to the manufacturer's instructions (InBios International, USA).

### Statistical analysis

Results were entered into Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and analyzed using GraphPad Prism™ (version 6.0 for Windows). Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to obtain the cut-off values, as well as sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and area under the curve (AUC) of the antigens. The one-way analysis of variance (ANOVA) was used for comparison between groups. The cut-off was determined through the mean of the negative samples plus two standard deviation. Confidence intervals with a 95% level (95%CI) and Youden index [(sensitivity + specificity) – 1] evaluated the antigen performance. Differences were significant with *p* values < 0.05.

## Results

### Characterization of the recombinant ChimLeish protein

Eight specific B-cell epitopes were predicted in the amino acid sequences of the LiHyT, LiHyD, LiHyP, and LiHyV proteins, with two linear epitopes selected for each protein (Table 1). The epitopes were combined in a single sequence with the addition of two glycine residues between them, in order to provide flexibility and avoid spatial overlap (Mendes et al. 2013; Lima et al. 2018). In addition, the epitope position was defined according to its original position in the native protein sequence, i.e., those near the N-terminus were maintained in this position, while the others near the C-terminus were maintained in this position in the chimera sequence. The arrangement of the amino acid sequences in the recombinant chimeric protein ChimLeish is shown in

**Table 1** Amino acid sequences of identified B-cell epitopes

Antigen	Origin protein	Amino acid sequence
Pept1	LiHyT (XP_001465138.1)	KLTSMTDPHEFKAIKRL
Pept2	LiHyT (XP_001465138.1)	RVQATEAQDRDLYARF
Pept3	LiHyD (XP_001468360.1)	PELYQQYVDYYVMYYE
Pept4	LiHyD (XP_001468360.1)	EPLLQQTQRAHMQRQQPAMPQPGYQPPPPM
Pept5	LiHyV (XP_001462854.1)	SQGASSGTCANAKCIPGNT
Pept6	LiHyV (XP_001462854.1)	SSFPIKGAALTVDYGRCE
Pept7	LiHyP (XP_001468385.2)	EETIRRRHEQRAARVK
Pept8	LiHyP (XP_001468385.2)	PRRLAAADLEELASAHEDFVAHLEKAKER

The amino acid sequences of the identified B-cell epitopes in the LiHyT, LiHyV, LiHyD, and LiHyP proteins are shown, as well as the corresponding proteins used to identify the epitopes

Fig. 1. Physical-chemical characterization of ChimLeish calculated a molecular weight of 19.2 kDa, an isoelectric point of 8.1, an estimated half-life of 30 min in yeasts and higher than 10 h in *E. coli*, and an aliphatic index of 54.8 suggesting that it is a stable protein. The solubility analysis identified hydrophilic amino acids in the protein sequence, suggesting that ChimLeish is also a soluble molecule.

### Diagnostic evaluation of the distinct antigens

An immunological evaluation to diagnose VL and VL/HIV coinfection cases was done using the synthetic peptides (Pept1 to Pept8), ChimLeish, and SLA as antigens in ELISA experiments. Results showed that all VL and VL/HIV coinfecting patients' sera presented individual OD values significantly above the cut-off ( $p < 0.05$ ), when ChimLeish was used as the antigen in the assays (Fig. 2). In addition, sera from patients with Chagas disease, tuberculosis, or malaria and from healthy individuals, all had OD values below of the cut-off and were not significant ( $p > 0.05$ ). Furthermore, most of the VL and VL/HIV coinfecting patient serum samples had OD values above of the cut-off when tested against the individual synthetic peptides; however, some minor cross-reactivity was observed for some of the peptides with other non-VL, non-VL/HIV sera, e.g., with sera from Chagas patients with Pept2, 4, 5, and 8 (Fig. 2). ROC curves were constructed using the OD values for the antigens and the results are shown in Fig. 3. The sensitivity and specificity values for ChimLeish were 100%, respectively, with AUC value of 1.0. Conversely, the sensitivity values for the synthetic peptides varied from 76.8 to 99.2%, and the specificity ranged from 67.1 to 95.7% (Table 2). The AUC values varied from 0.87 to 0.98. The SLA preparation showed sensitivity and specificity values of 56.8% and 69.5%, respectively, and AUC of 0.45.

### Humoral reactivity of VL and VL/HIV sera against a commercial kit

Samples of VL and VL/HIV coinfecting patients ( $n = 25$  each), which were all reactive with ChimLeish, were also tested with the Kalazar Detect™ Test kit. Results showed that the kit detected 20 of 25 (80.0%) VL and 12 of 25 (48.0%) VL/HIV coinfecting patients' sera, while five of 25 (20.0% cases) VL and 13 of 25 (52.0% cases) VL/HIV patients' sera were classified as false-negatives.

### Antibody response before and after VL treatment

The humoral reactivity of VL patient sera ( $n = 6$ ) was evaluated before and after treatment in the ELISA assays with the synthetic peptides, ChimLeish, and *L. infantum* SLA used as antigens. With ChimLeish, there was a significant ~80.0% reduction in OD after treatment ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4A), whereas using the synthetic peptides, the reduction in OD values was lower and ranged from ~10.0% for Pept5; ~30.0% for Pept6, 7, and 8; and 40.0–50.0% for Pept1, 2, 3, and 4. By contrast, there was no significant difference when SLA was used as the antigen, as expected ( $p > 0.05$ , Fig. 4A). These data were paralleled by the calculations of the IgG levels before and after treatment (Fig. 4B). Thus, the highest ratio was shown with ChimLeish as the ELISA antigen (6-fold), and the IgG ratios with the synthetic peptides more variable, ranging from 2 to 4. By contrast, the IgG ratio with SLA as antigen was unchanged after treatment (Fig. 4B).

### Discussion

In a recent immunoproteomic study performed with *L. infantum* species, parasite antigenic proteins were recognized by antibodies in sera from dogs with VL (Coelho et al. 2012), and some of these were later cloned and evaluated as recombinant versions for the diagnosis of leishmaniasis, e.g., LiHyT (Portela et al. 2018), LiHyD (Lage et al. 2016), LiHyV (Martins et al. 2015), and LiHyP (Coelho

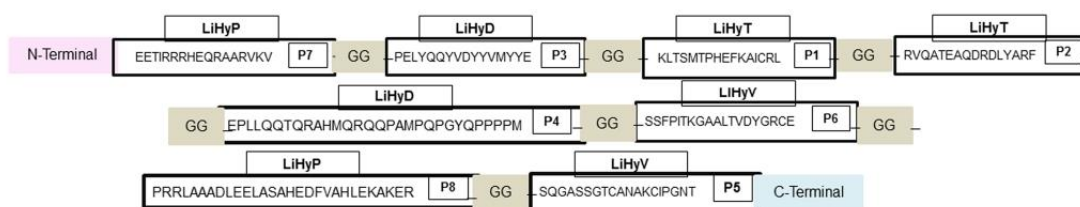
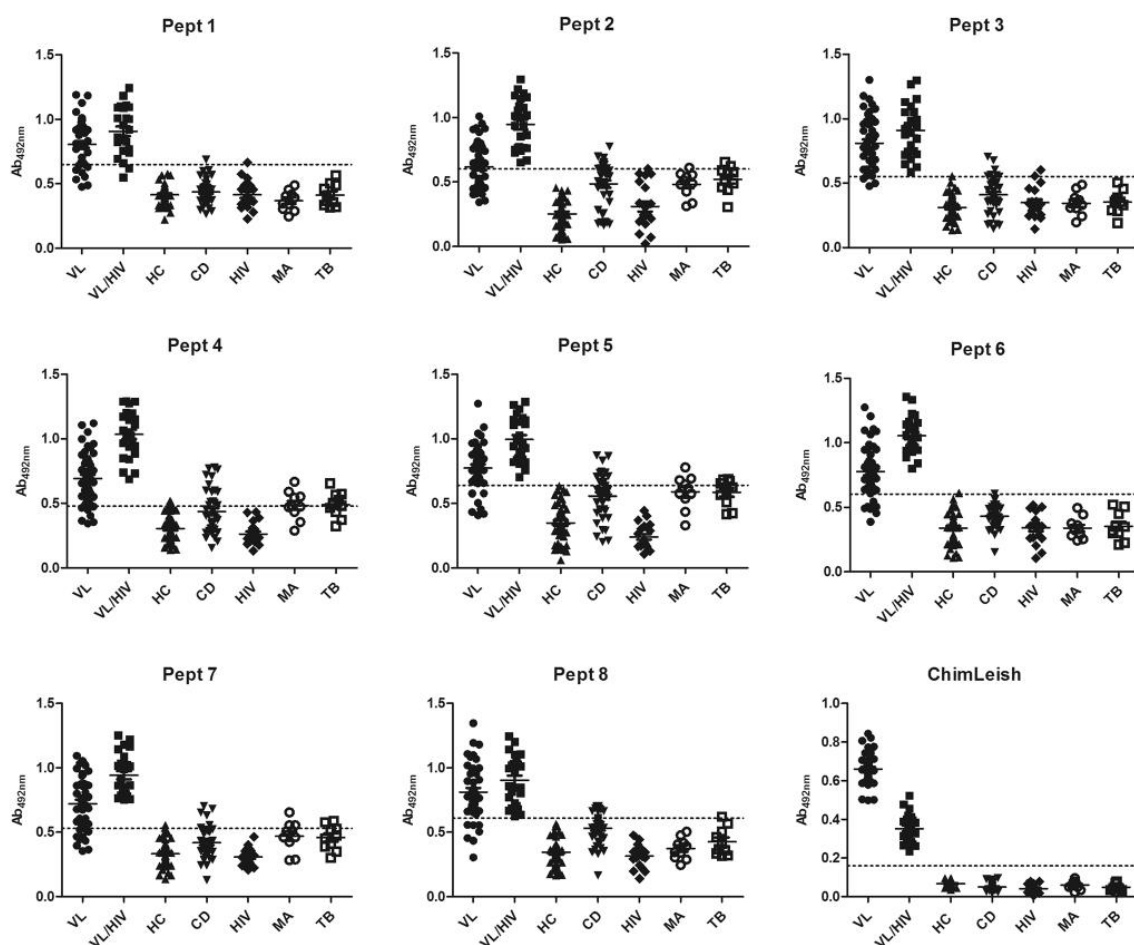


Fig. 1 Alignment of the eight B-cell epitopes to construct ChimLeish. The linear epitopes of the LiHyT, LiHyV, LiHyD, and LiHyP proteins were predicted and the sequences were linearly grouped with

a spacing of two glycine (GG) residues between them. The complete polypeptide sequence is shown





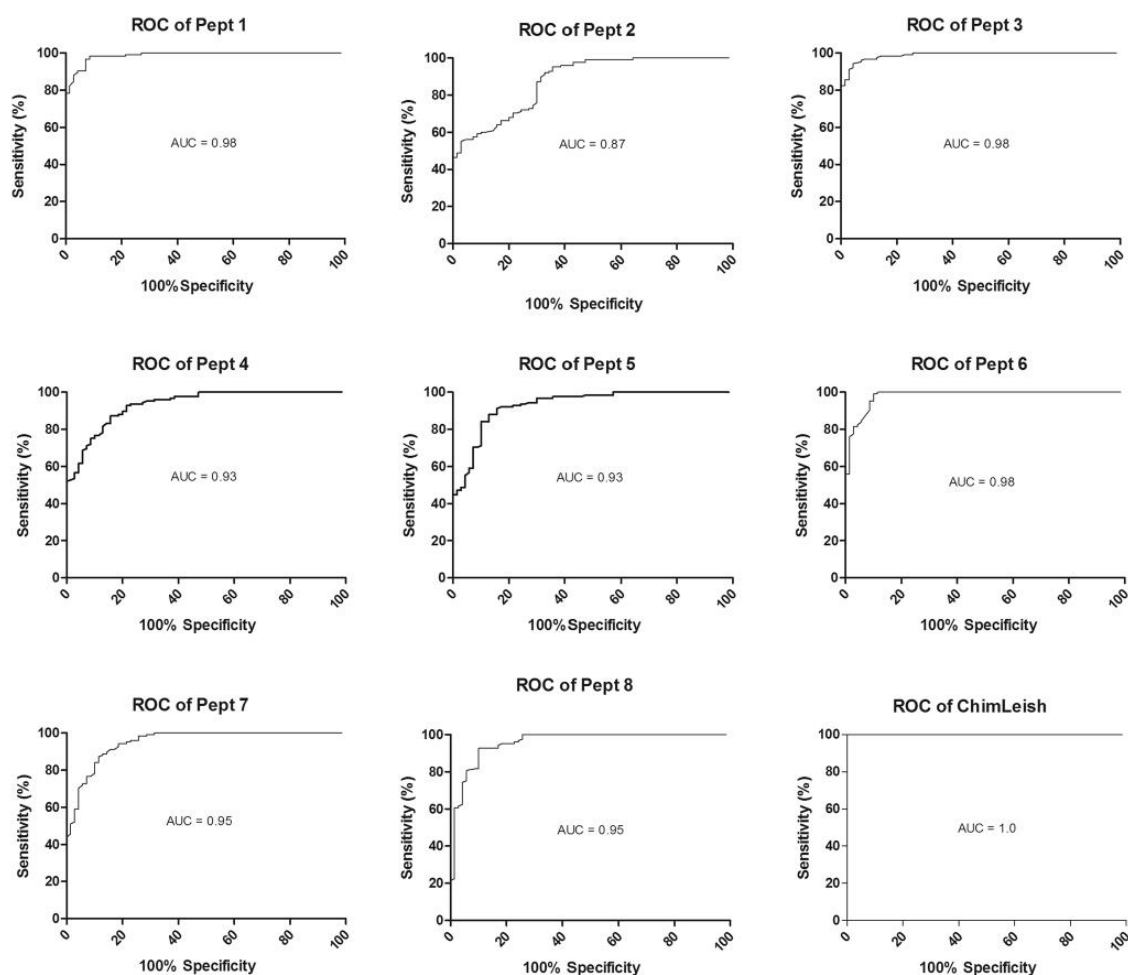
**Fig. 2** Serological evaluation of the synthetic peptides and ChimLeish. ELISA experiments were performed using the individual synthetic peptides and ChimLeish with serum samples from patients with visceral leishmaniasis (VL;  $n = 45$ ), VL/HIV coinfection ( $n = 25$ ), HIV infection ( $n = 20$ ), Chagas disease (CD;  $n = 40$ ), tuberculosis

(TB;  $n = 10$ ), and malaria (MA;  $n = 10$ ) and from healthy individuals living in endemic region of disease (HC;  $n = 45$ ). The cut-off values (horizontal dotted lines) were determined by receiver operator curves (ROC) analysis

et al. 2012). Commercial diagnostic kits offer good sensitivity and specificity to detect immunocompetent patients, but their performance depends on factors such as the nature of the produced detection antigen, geography, and the study population. In addition, detection of VL/HIV coinfection cases is lower with such kits due to the presence of lower amounts of specific antibodies (Lindoso et al. 2014; Kassa et al. 2020). Therefore, the identification and/or development of more refined diagnostic antigens would be desirable to overcome these limitations. In the present study, we developed a new recombinant chimera protein, ChimLeish, by combining the main linear B-cell epitopes predicted in the amino acid sequences of the LiHyT, LiHyD, LiHyV, and LiHyP proteins. ChimLeish was used in an ELISA platform

to diagnose VL and VL/HIV coinfection and it was compared with synthetic peptide versions of the individual B-cell epitopes and with a soluble parasite antigen preparation. The major findings from our study were that ChimLeish showed the highest sensitivity and specificity values for the diagnosis of VL and for VL in HIV coinfection patient sera, when compared to the other antigens and a commercial test, as well as presented no cross-reactivity with sera from patients with other endemic diseases, e.g., Chagas disease, tuberculosis, or malaria or with sera from healthy individuals.

The literature contains a variety of recombinant antigens that have been tested for the diagnosis of VL, although with reports of variable performance, as a consequence of the nature of the antigen used, the duration of infection, the host



**Fig. 3** Receiver operator curves (ROC) analysis. ELISA experiments using the synthetic peptides and ChimLeish were performed with the human serological panel and the individual optical density (OD) val-

ues were used to calculate the ROC curves. Results for each antigen are shown

immune status, and the presence of coinfections (Sakkas et al. 2016; Sarkari et al. 2018). In our study, ChimLeish showed 100% sensitivity and specificity for VL diagnosis. Recently, another recombinant chimeric protein called Q5 when used in ELISA showed sensitivity and specificity values of 82.0% and 100%, respectively, for VL diagnosis (Santos et al. 2020). Figueiredo et al. (2021) developed a recombinant chimeric protein called DTL-4 and when used in ELISA, this antigen presented sensitivity and specificity values of 94.6% and 99.4%, respectively. Taken together, our current study, supported by these additional studies, suggests that polypeptide-based recombinant antigens are promising candidates for the serodiagnosis of VL. Indeed, their levels of performance appear to exceed those reported for some

other potential individual antigens. For example, the recombinant H2B antigen was cloned from an Iranian isolate of *L. infantum* and tested with sera from VL patients, from healthy controls living in endemic and non-endemic areas of VL, and from patients with cross-reactive diseases. Recombinant H2B antigen showed sensitivity and specificity values of 71.3% and 69.6%, respectively, for VL diagnosis (Rezaei et al. 2019). In another study, three *Leishmania* hypothetical proteins called C1, C8, and C9 were also produced as recombinant proteins and tested as diagnostic antigens for human VL. Recombinant C1, C2, and C9 proteins presented sensitivity values of 66.2%, 58.2%, and 67.9%, respectively, and specificity values of 60.0%, 50.0%, and 77.7%, respectively (Fonseca et al. 2014).

**Table 2** Evaluation of the synthetic peptides and ChimLeish for the diagnosis of VL and VL/HIV coinfection

Antigen	Parameters									
	Sensitivity	95%CI	Specificity	95%CI	AUC	Cut-off	<i>p</i> value	PPV	NPV	Y
ChimLeish	100	97.1–100	100	94.8–100	1.0	<0.160	<0.0001	1.0	1.0	1.0
Pept1	98.4	94.3–99.8	81.4	70.3–89.7	0.98	<0.660	<0.0001	0.83	0.98	0.79
Pept2	91.2	84.8–95.5	67.1	54.9–77.9	0.87	<0.600	<0.0001	0.68	0.88	0.58
Pept3	94.4	88.8–97.7	95.7	88.0–99.1	0.98	<0.550	<0.0001	0.96	0.93	0.89
Pept4	76.8	68.4–83.9	90.0	80.5–95.9	0.93	<0.480	<0.0001	0.90	0.74	0.66
Pept5	84.0	76.4–89.9	90.0	80.5–95.9	0.93	<0.650	<0.0001	0.90	0.84	0.74
Pept6	99.2	95.6–100	90.0	80.5–95.9	0.98	<0.600	<0.0001	0.90	0.98	0.89
Pept7	91.2	84.8–95.5	84.3	73.6–91.9	0.95	<0.530	<0.0001	0.85	0.91	0.75
Pept8	92.0	85.8–96.1	90.0	80.5–95.9	0.95	<0.610	<0.0001	0.90	0.91	0.82
SLA	56.8	49.0–69.8	69.5	57.7–80.7	0.45	<0.544	0.1022	0.52	0.65	0.32

ELISA experiments were performed using the synthetic peptides, ChimLeish, and *L. infantum* SLA as antigens with sera from patients with visceral leishmaniasis (VL; *n* = 45), VL/HIV coinfection (*n* = 25), HIV-infected (*n* = 20), Chagas disease (CD; *n* = 40), tuberculosis (TB; *n* = 10), and malaria (MA; *n* = 10) and sera from healthy individuals living in endemic region of disease (*n* = 45). The sensitivity, specificity, area under the curve (AUC), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and Youden index (Y) were determined. The confidence interval (95%CI) and *p* value were also calculated and results are shown

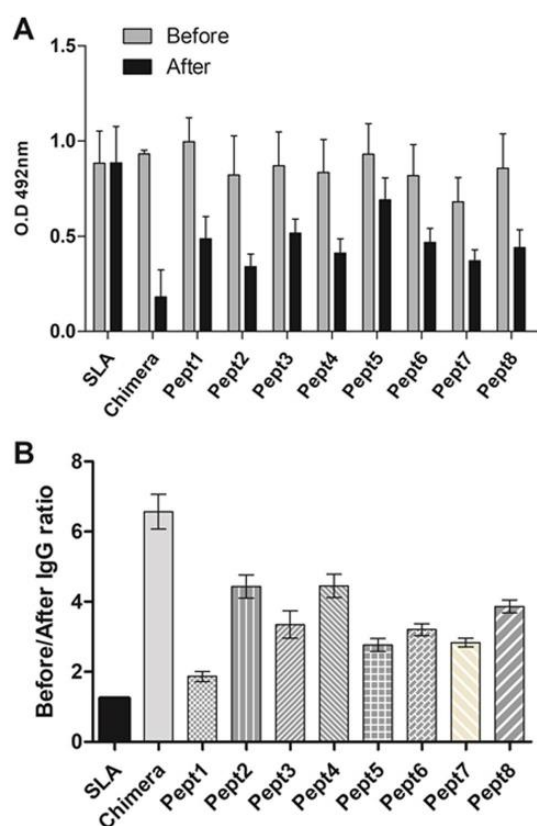
HIV coinfection presents an additional challenge for VL diagnosis. When associated with *Leishmania* infection, it can reduce anti-leishmanial serology in coinfecting patients and decrease the sensitivity of VL tests (Rezaei et al. 2018). Notably, in our present study, ChimLeish showed 100% sensitivity to detect VL/HIV coinfection cases and this level of performance is better than that reported for other potential diagnostic antigens. For example, the recombinant Lci2 and K39 antigens were tested for the diagnosis of VL and VL/HIV coinfection, and the antigens showed similar sensitivity (92.0%) for the diagnosis of VL, although a significant drop (32.0%) was found when coinfection cases were evaluated in the ELISA experiments (Ramos et al. 2021). Figueiredo et al. (2021) tested samples of VL/HIV coinfecting patients on their DTL-4 antigen in ELISA, and a sensitivity value of 77.4% was found, which was also a significant reduction when compared to the values obtained with sera from immunocompetent patients.

Small synthetic peptides have been also tested for the diagnosis of VL, with the rationale that a judicious selection of the core antigenic parts of the native proteins could both refine and reduce the variability of the patients' humoral response (Fargeas et al. 1996; Costa et al. 2017). Synthetic peptides have the advantage of being more simple and cheaper to produce than recombinant proteins (Costa et al. 2012). In our study, the eight peptides showed sensitivity values from 76.8 to 99.2%, and specificity values from 67.1 to 95.7%. Although the individual peptides showed a good, though variable, level of performance to detect active disease, none matched the performance of ChimLeish. Furthermore, much higher concentration of the individual peptides was required (5.0 µg/well) for ELISA, compared

with ChimLeish (0.25 µg/well), making the latter more cost-effective for routine use and population studies.

The long-term persistence of anti-leishmanial serology found in most treated patients is a confounding issue for monitoring the patient response to therapy and as a control of clinic cure (Almeida-Silva et al. 2006; Hasker et al. 2014; Dias et al. 2018). In the present study, we observed a significant reduction in anti-ChimLeish antibody levels in a small number of samples from patients collected at 6 months after treatment. By contrast, Mollett et al. (2019) evaluated anti-rK39 IgG antibody levels in serum samples collected before and after therapy from VL patients in India and found that there were no differences in humoral reactivity in a rK39-based ELISA. The authors concluded that serum reactivity with rK39 may not be a suitable clinical cure criterion for VL. Alternatively, a flow cytometry-based strategy has been developed as a tool for cure assessment of VL, using samples collected 12 months after treatment, and proved to be highly effective in differentiating negative from positive samples (Lemos et al. 2007). However, this strategy is unlikely to be used in resource-limited settings due to the high cost of cytometers and reagents.

Our study has some limitations. First of all, the absence of higher and diverse serological panels to include more samples from tegumentary leishmaniasis patients and from other cross-reactive diseases. Much larger sample sizes would also be useful to confirm the prognostic role of ChimLeish and further evaluate its suitability for monitoring patient clinical cure. Secondly, the use of a soluble parasite antigenic preparation as a control antigen in not wholly appropriate and other antigens, such as rK39, used in commercial diagnostic tests for VL, should



**Fig. 4** Humoral reactivity evaluated after VL treatment. The antibody response specific to synthetic peptides and ChimLeish was evaluated in VL patients ( $n = 6$ ), before and 6 months after treatment. The gray and black bars indicate the mean plus standard deviation of the optical density (OD) values observed in the samples collected before and after treatment, respectively (A). In addition, the ratio between antibody levels before and after treatment was calculated (B)

be considered. In summary, our data should be considered as providing proof-of-concept of ChimLeish for VL diagnosis. They suggest that ChimLeish deserves to be evaluated in large populations in future studies, and that its suitability as a diagnostic antigen should also be examined in other platforms, e.g., in rapid point-of-care lateral flow tests (Humbert et al. 2019).

**Acknowledgements** This work was supported by grant MR/R005850/1 from the Medical Research Council (Vaccine development for complex Intracellular neglected pATHogEns—VALIDATE), UK, and grant APQ-408675/2018-7 from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. The authors also thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the student scholarships.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

## References

- Almeida-Silva L, Romero HD, Prata A, Costa RT, Nascimento E, Carvalho SF, Rodrigues V (2006) Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 75:739–43
- Carvalho FA, Charest H, Tavares CA, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, Gazzinelli RT, Fernandes AP (2002) Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43:289–295
- Cipriano P, Miranda AC, Antunes I, Mansinho K (2017) Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: the challenge of relapse and treatment failure. *Acta Med Port* 30:443–448
- Coelho EAF, Tavares CAP, Carvalho FAA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlashewski G, Gazzinelli RT, Fernandes AP (2003) 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* 71:3988–3994
- Coelho VTS, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, Soto M, Santoro MM, Tavares CA, Fernandes AP, Coelho EA (2012) Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1430
- Costa MM, Penido M, Santos MS, Doro D, Freitas E, Michalick MS, Grimaldi G, Gazzinelli RT, Fernandes AP (2012) Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1622.
- Costa LE, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lima MP, Lima MIS, Portela ASB, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Menezes-Souza D, Machado-de-Ávila RA, Silveira JAG, Magalhães-Soares DF, Goulart LR, Coelho EAF (2017) Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Microb Pathog* 110:14–22
- Cota GF, Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A (2012) The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1665.
- Cota GF, Sousa MR, Freitas BMN, Gomes LI, Oliveira E, Assis TS, Mendonça AL, Pinto BF, Saliba JW, Rabello A (2013) Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. *Am J Trop Med Hyg* 89:570–577
- Coutinho JVSC, Santos FSD, Ribeiro RDSP, Oliveira IBB, Dantas VB, Santos ABFS, Tauhata JR (2017) Visceral leishmaniasis and leishmaniasis-HIV coinfection: comparative study. *Rev Soc Bras Med Trop* 50:670–674
- Dhom-Lemos L, Viana AG, Cunha JLR, Cardoso MS, Mendes TAO, Pinheiro GRG, Siqueira WF, Lobo FP, Teles LF, Bueno LL, Guimarães-Carvalho SF, Bartholomeu DC, Fujiwara RT (2019) *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): a novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS One* 14:e0211719.
- Dias DS, Ribeiro PAF, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lage DP, Costa LE, Portela ASB, Carvalho GB, Chávez-Fumagalli MA, Caligorne RB, Oliveira JS, Magalhães-Soares DF, Silva ES, Galdino AS, Menezes-Souza D, Duarte MC, Gonçalves

- DU, Coelho EAF (2018) Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitol Int* 67:344–350
- Fargeas C, Hommel M, Maingon R, Dourado C, Monsigny M, Mayer R (1996) Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 34:241–248
- Figueiredo MM, Santos ARR, Godoi LC, Castro NS, de Andrade BC, Sergio SAR, Jerônimo SMB, de Oliveira EJ, Valencia-Portillo RT, Bezerra LM, Goto H, Sanchez MCA, Junqueira C, Teixeira SMR, Fonseca FG, Gazzinelli RT, Fernandes AP (2021) Improved performance of ELISA and immunochromatographic tests using a new chimeric A2-based protein for human visceral leishmaniasis diagnosis. *J Immunol Res* 2021:5568077
- Fonseca AM, Faria AR, Rodrigues FT, Nagem RA, Magalhães RD, Cunha JL, Bartholomeu DC, Andrade HM (2014) Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop* 137:25–30
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2005) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3784–3788
- Hasker E, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Ostyn B, Kansal S, Singh RP, Singh OP, Chourasia A, Kumar Singh A, Shankar R, Wilson ME, Khanal B, Rijal S, Boelaert M, Sundar S (2014) *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2657
- Humbert M, Costa LE, Katis I, Ramos FF, Machado AS, Sones C, Coelho EAF, Christodoulides M (2019) A rapid diagnostic test for human visceral leishmaniasis using novel *Leishmania* antigens in a laser direct-write lateral flow device. *Emerg Microbes Infect* 8:1178–1185
- Kassa M, Abdellati S, Cnops L, Bremer Hinckel BC, Yeshanew A, Hailemichael W, Vogt F, Adriaensen W, Mertens P, Diro E, Van Griensven J, Van Den Bossche D (2020) Diagnostic accuracy of direct agglutination test, rK39 ELISA and six rapid diagnostic tests among visceral leishmaniasis patients with and without HIV coinfection in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0008963.
- Kevric I, Cappel MA, Keeling JH (2015) New World and Old World *Leishmania* infections: a practical review. *Dermatol Clin* 33:579–593
- Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Costa LE, Garde E, Dimer LM, Kursancew AC, Chávez-Fumagalli MA, Magalhães-Soares DF, Menezes-Souza D, Roatt BM, Machado-de-Ávila RA, Soto M, Tavares CA, Coelho EA (2016) 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* 115:1649–1658
- Lemos EM, Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, Pissinate JF, Martins-Filho OA, Dietze R (2007) Detection of anti-*Leishmania* (*Leishmania*) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 14:569–576
- Lima SA, Guerra-Duarte C, Costal-Oliveira F, Mendes TM, Figueiredo LFM, Oliveira D, Machado de Ávila RA, Ferrer VP, Trevisan-Silva D, Veiga SS, Minozzo JC, Kalapothakis E, Chávez-Olórtegui C (2018) Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles spider* toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Front Immunol* 9:653
- Lindoso JA, Cota GF, Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA, Sousa-Gomes ML, Santos-Oliveira JR, Rabello A (2014) Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3136
- Machado-de-Ávila RA, Stransky S, Velloso M, Castanheira P, Schneider FS, Kalapothakis E, Sanchez EF, Nguyen C, Molina F, Granier C, Chávez-Olórtegui C (2011) Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. *Peptides* 32:1640–1646
- Maia Z, Lirio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R (2012) *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1484
- Martins VT, Duarte MC, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Coelho CS, Magalhães-Soares DF, Fernandes AP, Soto M, Tavares CA, Coelho EA (2015) 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* 8:363
- Mendes TM, Oliveira D, Figueiredo LF, Machado-de-Ávila RA, Duarte CG, Dias-Lopes C, Guimaraes G, Felicori L, Minozzo JC, Chávez-Olórtegui C (2013) Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine* 31:2749–2755
- Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S (2010) Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 4:114–7
- Mohebbi M, Keshavarz H, Shirmohammad S, Akhondi B, Borjian A, Hassanpour G, Mamishi S, Mahmoudi S (2020) The diagnostic accuracy of direct agglutination test for serodiagnosis of human visceral leishmaniasis: a systematic review with meta-analysis. *BMC Infect Dis* 20:946
- Mohebbi M, Yimam Y (2020) Prevalence estimates of human immunodeficiency virus (HIV) infection among visceral leishmaniasis infected people in Northwest Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 20:214
- Mollett G, Hinckel BCB, Bhattacharyya T, Marlais T, Singh OP, Mertens P, Falconar AK, El-Safi S, Sundar S, Miles MA (2019) Detection of immunoglobulin G1 against rK39 improves monitoring of treatment outcomes in visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 69:1130–1135
- Okwor I, Uzonna J (2016) Social and economic burden of human leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 94:489–493
- Pereira MR, Rocha-Silva F, Graciele-Melo C, Lafuente CR, Magalhães T, Caligiorne RB (2014) Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Biomed Res Int*. 2014:639310.
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, Pountain AW, Mwenechanya R, Papadopoulos B (2017) Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0006052.
- Portela ÁSB, Costa LE, Salles BCS, Lima MP, Santos TTO, Ramos FF, Lage DP, Martins VT, Caligiorne RB, Lessa DR, Silva FR, Machado AS, Nascimento GF, Gama IS, Chávez-Fumagalli MA, Teixeira AL, Rocha MOC, Rocha RL, Coelho EAF (2018) Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis. *Immunobiology* 223:303–309
- Ramos REM, Santos WJT, Magalhães FB, Diniz GTN, Costa CHN, de Melo Neto OP, Medeiros ZM, Reis CRS (2020) Assessment of a recombinant protein from *Leishmania infantum* as a novel tool for visceral leishmaniasis (VL) diagnosis in VL/HIV co-infection cases. *PLoS One* 16:e0251861.
- Rezaei Z, Sarkari B, Dehghani M, Layegh-Gigloo A, Afrashteh M (2018) High frequency of subclinical *Leishmania* infection among HIV-infected patients living in the endemic areas of visceral leishmaniasis in Fars province, southern Iran. *Parasitol Res* 117:2591–2595
- Rezaei Z, Pouladfar G, Ramezani A, Mostafavi-Pour Z, Abbasian A, Sarkari B, Pourabbas B (2019) Importance of *L. infantum* H2b recombinant antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Iran J Immunol* 16:311–320

- Saha S, Raghava GPS (2006) Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 65:40–48
- Sanchez MCA, Celeste BJ, Lindoso JAL, Fujimori M, de Almeida RP, Fortaleza CMCB, Druzian AF, Lemos APF, Melo VCA, Miranda Paniago AM, Queiroz IT, Goto H (2020) Performance of rK39-based immunochromatographic rapid diagnostic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis using whole blood, serum and oral fluid. *PLoS One* 15:e0230610.
- Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S (2016) Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis* 53:8–16
- Santos WJT, Tavares DHC, Castro-Neto AL, Nascimento MB, Dhalia R, Albuquerque AL, Costa CHN, Magalhães FB, Rezende AM, Melo-Neto OP (2020) Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0008488.
- Sarkari B, Rezaei Z, Mohebbi M (2018) Immunodiagnosis of visceral leishmaniasis: current status and challenges: a review article. *Iran J Parasitol* 13:331–341
- Singh DP, Goyal RK, Singh RK, Sundar S, Mohapatra TM (2010) In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of kala-azar. *J Health Popul Nutr* 28:281–285
- Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S (2016) Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit Vectors* 9:277
- Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P (2012) Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res* 110:1065–1078
- Takagi H, Islam MZ, Itoh M, Islam AU, Saifuddin Ekram AR, Hussain SM, Hashiguchi Y, Kimura E (2007) Short report: production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 76:902–905
- Távora LG, Nogueira MB, Gomes ST (2015) Visceral leishmaniasis/HIV co-infection in northeast Brazil: evaluation of outcome. *Braz J Infect Dis* 19:651–656
- Thakur S, Joshi J, Kaur S (2020) Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis* 44:1–20
- Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R (2017) Leishmaniasis: a review. *F1000Res* 6:750.
- World Health Organization (2018) Leishmaniasis. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. Accessed 23 Jan 2021
- Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J (2001) Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop Med Int Health* 6:108–113

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 6.2 Conclusão do artigo 1

A proteína quimera recombinante denominada de *ChimLeish*, assim como os oito peptídeos preditos que deram origem a nova proteína, apresentaram uma elevada capacidade diagnóstica frente a amostras de soro de pacientes com LV e LV/HIV. Demonstrando, valores elevados de sensibilidade entre (76,8% a 100%), especificidade entre (67,1% a 100%) e AUC acima de 0,93, diferenciando-se ainda de amostras de indivíduos saudáveis residentes em áreas endêmicas e pacientes infectados com outras doenças de possível reação cruzada como Doenças de Chagas, malária, tuberculose e HIV. Os antígenos desenvolvidos demonstraram ainda uma importante atividade prognóstica, frente a soros de pacientes antes e após seis meses de tratamento de LV, onde foi possível detectar e diferenciar pacientes com a infecção ativa de pacientes com cura clínica. Os peptídeos individuais demonstraram bons resultados destacando-se os peptídeos 1, 3 e 6 com maior sensibilidade e especificidade quando comparado aos demais, enquanto a quimera destacou-se como melhor antígeno quanto aos índices de diagnósticos e prognósticos, também quando comparada a outros antígenos e testes comerciais atualmente aplicados.

### 6.3 Artigo 2 – Breve introdução e objetivos

O segundo artigo a se apresentado foi intitulado “**Sorodiagnóstico sensível e específico de leishmaniose tegumentar usando uma nova proteína quimérica baseada em epítomos específicos de células B de proteínas antigênicas de *Leishmania***”, publicado na revista internacional *Microbial Pathogenesis*. Ano de publicação 2021 – Fator de impacto de 3.848. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105341.

Com base nos resultados obtidos no artigo científico publicado e apresentado anteriormente, levantamos uma segunda hipótese em analisar os antígenos desenvolvidos quanto ao seu potencial diagnóstico e prognóstico para a doença de LT. O segundo artigo científico publicado, baseou-se nas limitações enfrentadas pelas LT na realização de testes diagnósticos eficazes. Atualmente as LT são diagnosticadas com base em manifestações clínicas associadas a dados epidemiológicos e laboratoriais. Os exames parasitológicos são os mais indicados, e baseiam-se no exame direto de amastigotas em esfregaços da lesão. No entanto, devido à escassez de parasitos nas amostras coletadas, principalmente em pacientes com lesões antigas, a sensibilidade é variável e entre 20% e 40% dos pacientes apresentam resultados falso-negativos (COELHO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018; SALLES et al., 2019; SILVA et al., 2018). Uma outra limitação enfrentada, é quando pacientes tratados mantêm a sorologia positiva por meses e/ou anos após o tratamento e cura clínica, sendo difícil diferenciá-los daqueles com doença ativa, assim como ocorre em pacientes de LV.

Nesse contexto, torna-se urgente a identificação de alvos diagnósticos mais sensíveis e específicos para LT, objetivando este estudo a avaliar peptídeos preditos de células B, a partir de quatro proteínas denominadas LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP, anteriormente encontrados em parasitos de *L. infantum*, onde já demonstraram potencial antigênico em soros de LV canina e/ou humana (COELHO et al., 2012; LAGE et al., 2016b; MARTINS et al., 2015; PORTELA et al., 2018). Além de avaliar a proteína quimérica originada pelos epítomos preditos, sendo ambos os antígenos testados frente a amostras de soros de pacientes infectados com LT e amostras de soros de pacientes antes e após seis meses de tratamento da doença, a fim de avaliar o potencial prognóstico na LT.





## Sensitive and specific serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis using a new chimeric protein based on specific B-cell epitopes of *Leishmania* antigenic proteins

Nathalia C. Galvani<sup>a</sup>, Amanda S. Machado<sup>a</sup>, Daniela P. Lage<sup>a</sup>, Vívian T. Martins<sup>a</sup>, Daysiane de Oliveira<sup>b</sup>, Camila S. Freitas<sup>a</sup>, Danniele L. Vale<sup>a</sup>, Bruna B. Fernandes<sup>b</sup>, João A. Oliveira-da-Silva<sup>a</sup>, Thiago A.R. Reis<sup>a</sup>, Thaís T.O. Santos<sup>a</sup>, Fernanda F. Ramos<sup>a</sup>, Raquel S. Bandeira<sup>a</sup>, Fernanda Ludolf<sup>a</sup>, Grasielle S.V. Tavares<sup>a</sup>, Nathalia S. Guimarães<sup>a</sup>, Unai Tupinambás<sup>a</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>c</sup>, Maria V. Humbert<sup>d</sup>, Denise U. Gonçalves<sup>a</sup>, Myron Christodoulides<sup>d,1</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>b,1</sup>, Eduardo A.F. Coelho<sup>a,e,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup> Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Peru

<sup>d</sup> Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital, Southampton, England, SO16 6YD, UK

<sup>e</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Tegumentary leishmaniasis  
B-cell epitopes  
Chimera  
Diagnosis  
ELISA  
Prognosis

### ABSTRACT

Serological tests used for the diagnosis of tegumentary leishmaniasis (TL) presents problems, mainly related to their variable sensitivity and/or specificity, which can be caused by low levels of antileishmanial antibodies or by presence of cross-reactive diseases, respectively. In this context, the search for new antigenic candidates presenting higher sensitivity and specificity is urgently required. In the present study, the amino acid sequences of the LiHyT, LiHyD, LiHyV, and LiHyP proteins, which were previously showed to be antigenic in the visceral leishmaniasis (VL), were evaluated and eight B-cell epitopes were predicted and used for construction of gene codifying a chimeric protein called ChimLeish. The protein was expressed, purified and evaluated as a recombinant antigen in ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) for the diagnosis of TL. The own B cell epitopes used to construct the chimera were synthesized and also evaluated as antigens, as well as a soluble *Leishmania braziliensis* antigenic extract (SLA). Results showed that ChimLeish presented 100% sensitivity and specificity to diagnose TL, while synthetic peptides showed sensitivity varying from 9.1% to 90.9%, while specificity reached from 98.3% to 99.1%. SLA showed sensitivity and specificity of 18.2% and 98.3%, respectively. A preliminary prognostic evaluation showed that anti-ChimLeish IgG antibodies declined in significant levels, when serological reactivity was compared before and six months after treatment, suggesting also a possible prognostic role of this antigen for TL.

### 1. Introduction

Leishmaniasis are neglected tropical diseases caused by protozoa parasites of the genus *Leishmania*, which are endemic in 98 countries in

the world with 380 million people exposed to the infection risks, and 12 million people clinically affected [1]. There is an annual estimated incidence of 0.7–1.2 million cases of tegumentary leishmaniasis (TL) and 0.5 million cases of visceral leishmaniasis (VL) registered [2,3]. TL

\* Corresponding author. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: [eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br](mailto:eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br) (E.A.F. Coelho).

<sup>1</sup> Co-senior authors of the work.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105341>

Received 25 August 2021; Received in revised form 27 November 2021; Accepted 29 November 2021

Available online 6 December 2021

0882-4010/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

causes distinct clinical manifestations in patients, such as cutaneous leishmaniasis (CL), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), and mucosal leishmaniasis (ML). This disease complex is caused by several parasite species, such as *Leishmania braziliensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, among others [4].

The diagnosis of TL relies on clinical manifestations associated with epidemiological and laboratory data. As there is no gold-standard test to diagnose the disease, a combination of methods is usually required to obtain the precise diagnosis [5]. Parasitological tests, which are based on the direct examination of amastigotes in Giemsa-stained lesion smears of scraping, biopsies or impression smears, have been used with such purpose. However, due to the scarcity of parasites in the collected samples, mainly in patients with old lesions, the sensitivity is variable and between 20% and 40% of the patients present false-negative results [6–9]. Molecular tests have also been used as more sensitive tools to detect *Leishmania* content in collected samples. PCR-based assays have obtained higher sensitivity to detect TL patients as compared to conventional parasitological methods. However, these tests are expensive, require sophisticated equipment and trained professionals to perform, as well as the sample collection is also invasive; limiting then their use [10, 11].

Serological tests have been applied for the detection of anti-leishmanial antibodies in sera of infected hosts, and high efficacy has been reached for VL [12]. These tests are simpler and cheaper, when compared to the parasitological methods, and the sample collection is considered less invasive [12,13]. However, serological tests to diagnose TL have showed lower sensitivity, mainly due to the presence of low levels of antileishmanial antibodies [14,15]. In addition, the specificity has been also variable by the presence of cross-reactive antigens in patients developing leprosy, malaria, tuberculosis, histoplasmosis, aspergillosis, systemic lupus erythematosus, among others [14–19]. There are also cases where treated patients maintain positive serology for months and/or years after treatment and clinic cure, being difficult to differentiate them from those with active disease [20,21]. In this context, the search continues to identify more sensitive and specific diagnostic targets for TL.

Our group performed an immunoproteomic study to identify *Leishmania* proteins with application potential for the diagnosis of leishmaniasis [22]. Some of these antigens, evaluated as individual recombinant proteins, satisfactory diagnostic action against canine and/or human VL, such as LiHyT [23], LiHyD [24] and LiHyV [25]. LiHyP, a hypothetical protein also identified in the cited immunoproteomic study, showed specific B-cell epitopes in its amino acid sequence; suggesting then the potential use as diagnostic marker to detect the disease. Considering the similarities between the amino acid sequences of LiHyT, LiHyD, LiHyV, and LiHyP proteins in distinct *Leishmania* spp.; in the present study, linear B-cell epitopes were predicted in the sequences of these four proteins, and they were used to construct the gene codifying a chimeric protein. This new antigen, called ChimLeish, was cloned and the recombinant chimera was purified and evaluated in ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) for the diagnosis of TL. The B cell epitopes used to construct the chimeric protein were also synthesized and tested in the experiments, as well as a soluble *L. braziliensis* antigenic extract (SLA). Results suggested that ChimLeish presented 100% sensitivity and specificity to detect TL patients, including those presenting lower anti-parasite serology; while synthetic peptides and SLA showed lower sensitivity and specificity values, mainly to diagnose CL cases. Evaluating a possible prognostic role of the antigens, low levels of anti-ChimLeish IgG antibodies were found in sera of treated patients, which were similar to those obtained in healthy subjects; suggesting also a prognostic role of this antigen for TL.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasites

*L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904) stationary promastigotes were grown at 24 °C in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) added with 20% (v/v) inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin at pH 7.4. The antigenic extract was prepared from 10<sup>9</sup> parasites according to described in Ref. [26]. Briefly, stationary promastigotes were washed three times in sterile phosphate-buffered saline (PBS 1x pH 7.4) and submitted to six cycles of freezing and thawing, at which time they were submitted to ultrasonication (Ultrasonic processor, GEX600) with five cycles of 30 s at 38 MHz. The supernatant containing SLA was collected after centrifugation (9000×g for 30 min at 4 °C) and stored at –70 °C until use.

### 2.2. Prediction of B-cell epitopes and construction of chimeric protein

The amino acid sequences of LiHyT (XP\_001465138.1), LiHyD (XP\_001468360.1), LiHyV (XP\_001462854.1), and LiHyP (XP\_001468385.2) proteins were obtained from the SwissProt server (web.expasy.org/docs/swiss-prot) and saved in TXT format [27]. The IEDB server (www.iedb.org) was used to identify the most accessible amino acids in the primary structures using the parameters: window size of 12 and threshold value of 1.0. Next, epitopes were predicted using the ABCpred server (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/) with the parameters: window size of 16 and threshold value of 0.85. Eight epitopes were selected and their amino acid sequences were used to construct the chimera-codifying gene. Aiming to provide flexibility and avoid spatial overlap between the epitopes in the protein sequence, two glycine residues were included between each peptide sequence. Both the ChimLeish-codifying gene, which was cloned into pET28a-TEV vector, and B cell epitopes (Pept1, Pept2, Pept3, Pept4, Pept5, Pept6, Pept7 and Pept8) were commercially produced (Genscript®, USA). The lyophilized peptides were diluted in milli-Q water before use in the experiments. The construct was inserted into *E. coli* Arctic Express cells, and the protein expression was induced by addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (1.0 mM; Promega®, Canada) for 2 h at 37 °C. Next, bacteria were centrifuged at 3000×g for 10 min at 4 °C, and then disrupted with six cycles of freezing and thawing, followed by six cycles of ultrasonication with cycles of 30 s each (36 MHz). Cellular debris was removed after centrifugation (5000×g for 15 min at 4 °C) and the supernatant was collected and concentrated in Amicon® ultra15 filters with a nominal molecular weight limit of 10,000 (NMWL, Millipore, Germany). The recombinant protein was purified on a HisTrap HP affinity column (GE Healthcare Life Sciences, USA) connected to an AKTA system. After purification, ChimLeish (19.2 kDa) was passed through a polymyxin-agarose column (Sigma-Aldrich, USA) in order to remove any residual endotoxin content (<10 ng of LPS per 1 mg of recombinant protein, measured by the Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Assay QCL-1000 kit, BioWhittaker, USA). SDS-12% PAGE gels were used to evaluate the purification profile.

### 2.3. Study population and sera samples

The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), with protocol number CAAE-32343114.9.0000.5149. Sera samples of CL (n = 25; including 15 males and 10 females, with ages ranging from 27 to 56 years old) and ML (n = 30; including 18 males and 12 females, with ages ranging from 29 to 63 years) patients, all living in endemic area of TL (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), were used. The diagnosis was confirmed by clinical exams and parasitological tests to detect parasites by Giemsa-stained smears from lesion and/or mucosal fragments, as well as by identification of parasite content by

PCR technique according described [28]. Briefly, DNA was extracted from collected samples using the QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qia-gen®, MD, USA), purified and assayed by spectrophotometry. It was then diluted in sterile ultrapure water and the following primers were used to amplify a *Leishmania* kDNA region (150 base pairs) in TL patient samples: 5'-GGGKAGGGGCGTTCTSCGAA-3' (Forward) and 5'-SSSWCTATWTTACACCAACCCC-3' (Reverse). The parasite DNA extracted of a reference strain for TL (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) was used as positive control, while sterile ultrapure water was used as negative control. For reactions, the following reagents were used: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 0.6 μM of each primer (Sigma-Aldrich, USA), 1 UI Taq DNA polymerase with specific buffer (Invitrogen, USA), and 20 ng DNA templates. The program applied was: (step 1) 94 °C for 10 min; (step 2) 60 °C for 30 s; (step 3) 72 °C for 30 s; (step 4) 94 °C for 30 s and go to step 2 for 42 times; (step 5) 72 °C for 10 min [28]. The amplified product was analysed by polyacrylamide gel. CL patients presented an assumed disease evolution time varying from 4 months to 8 years, while ML patients presented an assumed disease evolution time ranging from 6 months to 12 years. None of the TL patients had been treated before sample collection. Sera were also collected from healthy individuals living in endemic region of disease (n = 25, including 14 males and 11 females, with ages ranging from 26 to 42 years; Belo Horizonte). These subjects presented no clinical signal of leishmaniasis. Samples of Chagas Disease patients (n = 25, including 16 males and 9 females, with ages ranging from 33 to 59 years), which were diagnosed by hemoculture, Chagatest® recombinant ELISA v.4.0 kit and/or Chagatest® hemagglutination inhibition (Wiener lab., Rosario, Argentina), as well as from patients with leprosy (n = 20, with 12 males and 8 females, with ages ranging from 35 to 55 years), aspergillosis (n = 15, including 8 males and 7 females, with ages ranging from 34 to 60 years) and histoplasmosis (n = 15; including 6 males and 9 females, with ages ranging from 30 to 56 years) were used. The diagnosis of these diseases was confirmed by means of ML Flow rapid test, detection of fungal hyphae in histopathological examination, and isolation of the fungus in culture of bronchoalveolar lavage fluids and/or whole blood, respectively. Additionally, sera of HIV-infected patients (n = 15, including 9 males and 6 females, with ages ranging from 28 to 50 years), which were diagnosed by means of clinical exam and laboratory tests for CD4<sup>+</sup> T cell count and determination of the viral load, were also used.

#### 2.4. Serological follow-up after treatment

Sera samples from ML patients (n = 15) were collected before and six months after treatment, when the humoral response specific to ChimLeish, synthetic peptides and SLA was evaluated. The patients were submitted to the same therapeutic regimen using pentavalent antimonials (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brazil), at a dose of 20 mg Sb<sup>3+</sup> per kg for 30 days. In addition, none of them suffered from other infection or had any pre-existing disease. After completion of the treatment, all patients were free of any sign of leishmaniasis and were classified as clinically cured.

#### 2.5. Immunoblotting assays

Immunoblottings were performed using ChimLeish, which was submitted (10 μg) to SDS-12% PAGE gels and blotted onto a nitrocellulose membrane (0.2 μm pore size, Sigma-Aldrich, USA). Next, membranes were blocked with PBS-T plus 5% bovine serum albumin (BSA) (w/v) and incubated for 1 h at 37 °C. A new incubation with sera pools of healthy subjects (n = 4) or patients with CL or ML (n = 4 each) was performed for 1 h at 37 °C, with sera samples 1:100 diluted in PBS-T. Next, membranes were washed with PBS-T and an anti-human IgG horseradish-peroxidase conjugated antibody was added in the plates (diluted 1:10,000 in PBS-T; Sigma-Aldrich, USA), when a new incubation was performed for 1 h at 37 °C. After, reactions were developed using a solution composed by chloronaphthol, diaminobenzidine and

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min, and stopped by adding distilled water. A low range protein ladder standard (Invitrogen™, Life Technologies, USA) was used. Three independent experiments were performed and results were similar.

#### 2.6. Serological assays

Previous titration curves were performed to determine the most appropriate concentration of antigens and sera dilutions to be used in the experiments. Microtiter immunoassay plates (Jetbiofil®, Belo Horizonte) were coated with ChimLeish (0.5 μg/well), individual peptides (5.0 μg/well, all antigens) or *L. braziliensis* SLA (2.0 μg/well), which were diluted in coating buffer (50 mM carbonate buffer at pH 9.6), for 18 h at 4 °C. Next, free binding sites were blocked using 250 μL of PBS-T plus 5% BSA (w/v) per well for 1 h at 37 °C. After washing the plates five times with PBS-T, they were incubated with the individual serum samples (1:100 diluted for synthetic peptides and SLA or 1:200 diluted for ChimLeish, both in PBS-T), and incubated for 1 h at 37 °C. Plates were washed five times with PBS-T and incubated with an anti-human IgG peroxidase conjugated antibody (1:10,000 for peptides and SLA, and 1:20,000 for ChimLeish, both in PBS-T) for 1 h at 37 °C. After washing the plates six times with PBS-T, reactions were developed by incubation with 100 μL per well of a solution composed by 2 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 mg ortho-phenylenediamine and 10 mL citrate-phosphate buffer at pH 5.0, for 30 min and in the dark. Reactions were stopped by adding 25 μL 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The optical density (OD) values were measured in a microplate reader (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) at 492 nm. All samples were tested in parallel on the same day to reduce experimental variation.

#### 2.7. Statistical analysis

Results were entered into Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and analysed with GraphPad Prism™ software (version 6.0 for Windows). The cut-off values for each antigen were determined by constructing Receiver Operating Characteristic (ROC) curves, which were plotted with the individual OD values of TL patients group versus those from the other (healthy individuals and patients with Chagas Disease, leprosy, histoplasmosis, aspergillosis or HIV-infected) groups. ROC curves were used to calculate: sensitivity (Se), specificity (Sp), area under the curve (AUC), confidence interval using a 95% level (95% CI), likelihood ratio (LR), and Youden index (Y). The unpaired two-tailed t-test was used and differences were considered statistically significant with *P* < 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Construction and characterization of ChimLeish protein

Eight linear B-cell epitopes were predicted in the amino acid sequences of LiHyT, LiHyD, LiHyV and LiHyP proteins, with two epitopes identified in each protein sequence. In addition, the amino acid sequences of the selected epitopes were found to be conserved in distinct *Leishmania* species (Fig. 1). With the purpose to provide flexibility and to avoid the spatial overlap between epitopes in the protein sequence, two glycine residues were included between them (Fig. 2). After purification, ChimLeish was showed to be a soluble protein and with high purification yield (higher than 95.0%), which can be visualized in a representative SDS-12% PAGE gel (Fig. 3A, lane 2). Immunoblotting assays showed that, while ChimLeish was not recognized by antibodies in sera of healthy individuals (Fig. 3B, lane 2), it was specifically recognized by samples of CL and ML patients (Fig. 3B, lanes 3 and 4, respectively). In both cases, a low range protein ladder standard was used (Fig. 3A and B, lane 1 in both).

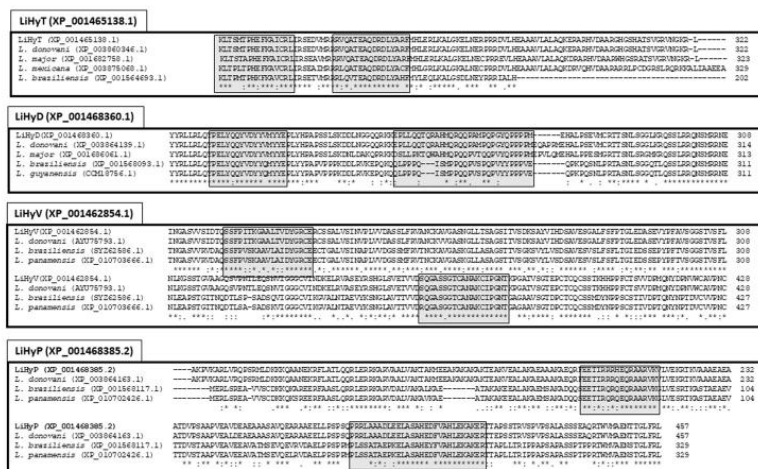


Fig. 1. Bioinformatic assays and identification of linear B-cell epitopes. The amino acid sequences of LiHyT (XP\_001465138.1), LiHyD (XP\_001468360.1), LiHyV (XP\_001462854.1) and LiHyP (XP\_001468385.2) proteins were evaluated by bioinformatic tools, and two linear B-cell epitopes were identified in each sequence. The selected epitopes are shown in grey squares. "\*" indicates identical amino acid, "~" indicates similar amino acid, and "." indicates low similarity amino acid.

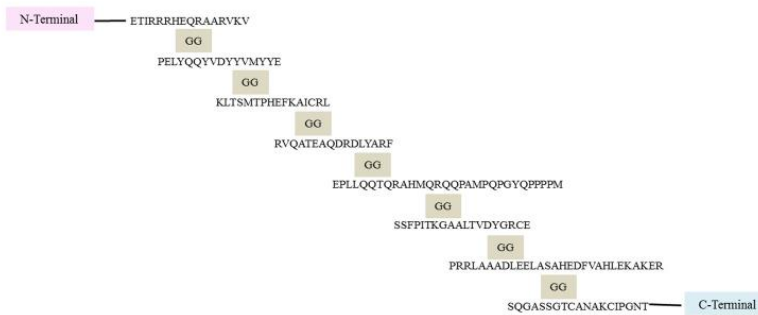


Fig. 2. Construction of the chimeric protein. The selected B-cell epitopes were grouped in a linear sequence with the inclusion of two glycine residues between each epitope, and the chimeric protein sequence is shown.

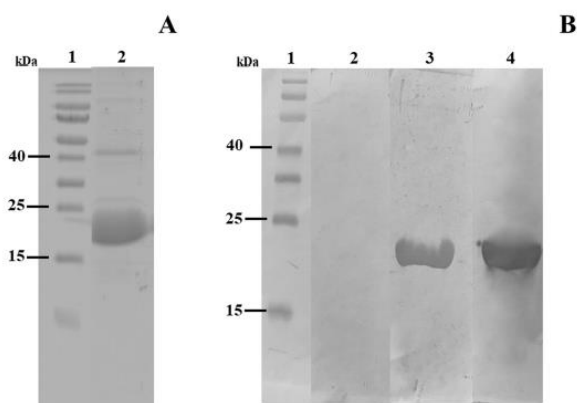
3.2. Evaluation of antigens for the diagnosis of tegumentary leishmaniasis

The diagnostic efficacy for the detection of TL cases was evaluated using ChimLeish, synthetic peptides and SLA as antigen by means of ELISA against a human serological panel. Results showed that the recombinant protein was recognized by sera in CL and ML patients, but not by those from healthy subjects or of patients presenting TL-related diseases; with statistically significant differences being found between the groups ( $P < 0.0001$ ). Results are presented as box plots, with indication of the minimum and maximum values obtained for each antigen (Fig. 4). The higher serological variation found in the TL group, when synthetic peptides and SLA were used as antigens, can be explained by the fact that CL patients usually present lower antileishmanial serology, making difficult to be reactive against a diverse antigenic preparation, as well as by the fact that peptides are short antigens and that usually present higher difficulty to be identified by antibodies in ELISA plates. Otherwise, lower serological variation was found when ChimLeish was used as an antigen (Fig. 4); suggesting then that this antigen presented a more homogeneous recognition by antibodies present in sera of CL and ML patients. ROC curves were constructed for each antigen and results are shown (Fig. 5), as well as the sensitivity and specificity values were determined. Results showed that ChimLeish presented both 100%

sensitivity and specificity, while synthetic peptides showed sensitivity ranging from 9.1% to 90.9%, and specificity varying from 98.3% to 99.1% (Table 1). SLA showed sensitivity and specificity values of 18.2% and 98.3%, respectively; thus concluding that ChimLeish was the best antigen applied for the diagnosis of TL when our serological panel was evaluated in ELISA.

3.3. Serological follow-up after treatment

The antibody response against the antigens was evaluated comparatively before and six months after patient treatment (Fig. 5). Results showed that anti-ChimLeish IgG antibodies significantly declined after therapy as compared to OD values obtained before treatment. Using SLA as antigen, the serological reactivity was similar before and after treatment (Fig. 5A). Testing the synthetic peptides, lower humoral response was found after patient treatment, although data using the chimeric protein have been more expressive. With the OD values obtained before and after treatment, ratios between IgG levels using each antigen were calculated and results are also shown (Fig. 5B). Data indicate that anti-chimera antibodies declined in more significant levels after therapy, when compared to values obtained using the synthetic peptides or SLA.



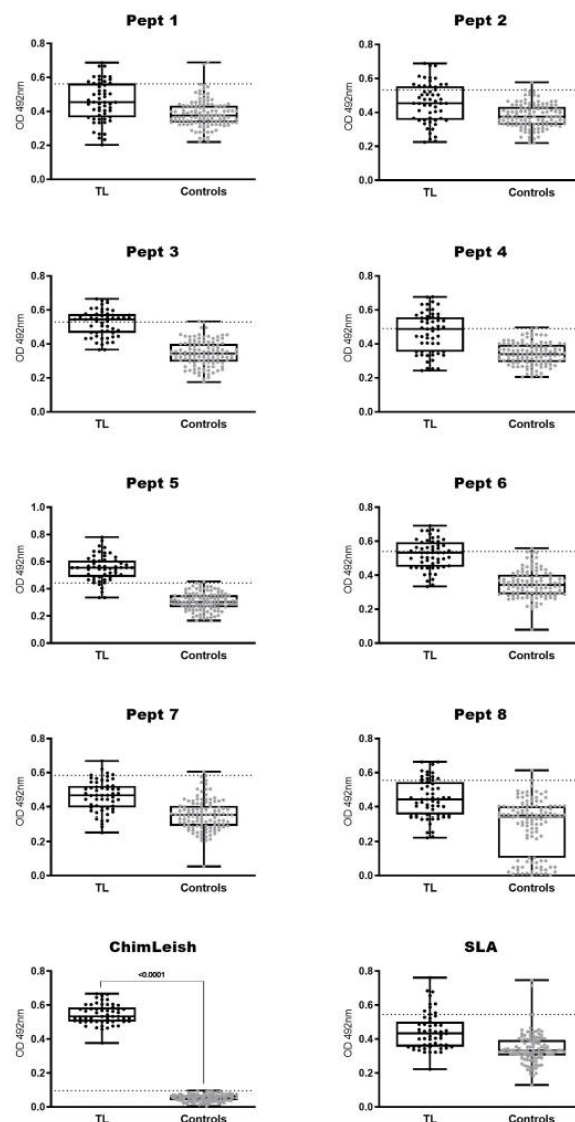
**Fig. 3.** SDS-12% PAGE gels and immunoblottings. The ChimLeish protein was evaluated by means of SDS-12% PAGE gels and one representative preparation is shown (in A). A low range protein ladder standard was used (lane 1), and the purified protein presented purity degree higher than 95.0% (lane 2). Immunoblottings were performed using TL patients and healthy subject sera, and results are shown (in B). A low range protein ladder standard was used (lane 1), and the reaction of protein against sera pools ( $n = 4$  in each) of healthy subjects (lane 2) and CL (lane 3) and ML (lane 4) patients is also shown.

#### 4. Discussion

Distinct clinical manifestations are caused by leishmaniasis in humans. VL is the most serious clinical form of the disease and is responsible by death of approximately 59,000 people annually [29]. TL is not considered a fatal disease; however, it can cause since a localized cutaneous lesion that appears ulcerated, with granular base and raised borders, until lesions causing gradual tissue destruction, affecting the upper respiratory and digestive tracts mucosa of the patients [23]. In this context, a precise diagnosis of this disease complex is essential to perform a rapid treatment aiming to improve the quality of life of the patients, and serological tests have been considered important tools for the diagnosis of leishmaniasis, due to their simplicity, high performance, reproducibility, and low cost [30]. In the VL, symptomatic patients usually develop high antileishmanial serology, and they are precisely diagnosed in the available tests [31–33]. However, in the TL, the anti-parasite antibody production is usually lower against *Leishmania* antigens, mainly in CL cases, and diagnostic tests are not effective to detect the disease [34].

In a previous work developed by our group, *L. infantum* proteins were recognized by antibodies in sera of VL dogs, and they were suggested as potential diagnostic markers for disease [22]. In fact, some of these antigens, such as LiHyT [23], LiHyD [24] and LiHyV [25], were cloned and the recombinant proteins were individually tested as diagnostic markers for VL, and promising results being obtained. However, to the best of our knowledge, none of these antigens were tested for the diagnosis of TL. Otherwise, the association of diagnostic antigens could represent better diagnostic accuracy for leishmaniasis, when compared to the use of individual proteins, since higher antigenic variety represented by distinct B cell epitopes derived from different parasite proteins could be included in the protein sequence, making it easier to be recognized by antibodies in sera of infected hosts [35]. In this context, the development of polypeptide-based chimeric proteins could result in high sensitivity and specificity values for the diagnosis of leishmaniasis, as well as present low production cost due to the fact that it is an unique protein [36].

In this context, in the present study, the amino acid sequences of LiHyT, LiHyD, LiHyP, and LiHyV proteins were mapped and the main B-cell epitopes were identified and used to construct a recombinant chimeric protein, which was tested for the diagnosis of TL. The chimera



**Fig. 4.** Serological assays using ChimLeish, synthetic peptides and SLA as antigens. ELISA was performed with ChimLeish, synthetic peptides (Pept 1, Pept 2, Pept 3, Pept 4, Pept 5, Pept 6, Pept 7, and Pept 8) and SLA as antigens, which were reacted against sera of CL ( $n = 25$ ) and ML ( $n = 30$ ) patients characterized as ‘TL group’, as well as against samples of healthy individuals living in endemic region of disease ( $n = 25$ ) or patients with Chagas Disease ( $n = 25$ ), leprosy ( $n = 20$ ), histoplasmosis ( $n = 15$ ) and aspergillosis ( $n = 15$ ) or those HIV-infected ( $n = 15$ ); which were characterized as ‘control group’. The individual optical density (OD) values and box plots representing the minimum and maximum values are shown. The dotted lines indicate the cut off values for each antigen evaluated. Statistically significant difference ( $P < 0.0001$ ) between (TL and Controls) groups is also indicated. Abbreviation: SLA- Soluble *L. braziliensis* Antigenic Extract.

was showed to be a soluble protein and with high purification yield and it was tested in ELISA for the diagnosis of TL, here represented by sera of CL and ML patients. The B cell epitopes used to construct the chimera sequence were produced as synthetic peptides, and they were also used as antigens in the experiments, as well as a soluble *L. braziliensis*

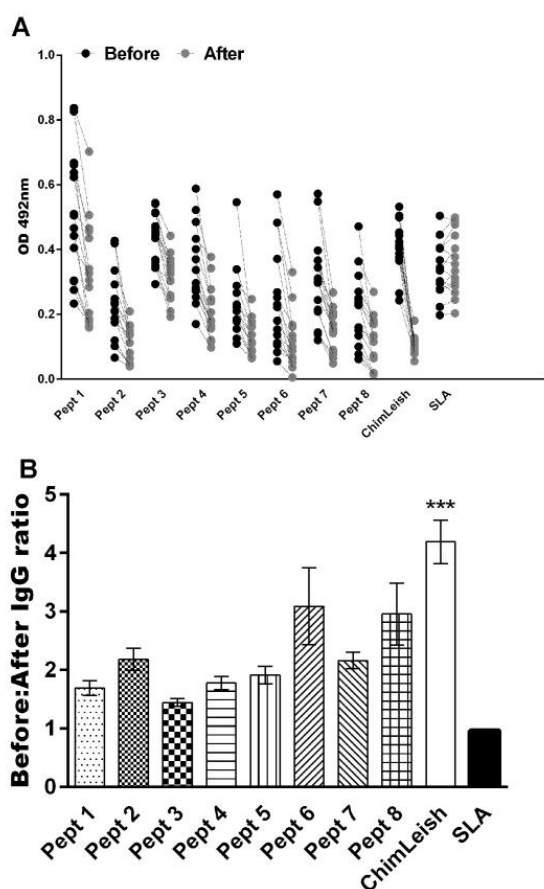


Fig. 5. Serological follow-up after treatment. Levels of IgG antibodies specific to ChimLeish, synthetic peptides (Pept 1, Pept 2, Pept 3, Pept 4, Pept 5, Pept 6, Pept 7, and Pept 8) and SLA were evaluated by ELISA using sera of ML patients collected before and six months after treatment ( $n = 15$ ). Black and grey circles represent the optical density (OD) values of the samples obtained before and after treatment, respectively (in A). Ratios between antibody levels before and after therapy were also calculated, and results are shown (in B). Abbreviation: SLA- Soluble *L. braziliensis* Antigenic Extract. (\*\*\*) indicate statistically significant difference in relation to the other groups ( $P < 0.05$ ).

antigenic extract. Results showed that ChimLeish was identified by all TL patient sera, including CL patients samples, and presented low cross-reactivity against antibodies in sera from healthy subjects or patients developing Chagas Disease, leprosy, malaria, tuberculosis, histoplasmosis, and aspergillosis or those HIV-infected. Although some synthetic peptides showed satisfactory diagnostic performance, their sensitivity and specificity values were lower in comparison to data obtained using ChimLeish as antigen, mainly to detection of CL cases, since these patients usually present lower antileishmanial serology [37,38]. In addition, SLA as antigen showed also lower sensitivity in ELISA for the detection of CL patients.

The diagnosis of CL and ML is based on clinical exams associated with parasitological and/or immunological analyses. However, problems related to the sensitivity of tests have been registered, mainly due to the longer lesion time, which can reflect in a lower number of parasites, hampering then the sensitivity of the tests [19,39]. Regarding serological diagnosis, CL patients usually tend to present low levels of anti-*Leishmania* antibodies, and they can be mis-diagnosed as false-negative in the laboratorial assays [40]. The present study's results showed that SLA, a mixture of *Leishmania* antigenic and non-antigenic proteins and that present distinct expression levels, presented also low sensitivity to detect CL. Serological results were similar to those described in other works evaluating antigens for the diagnosis of TL [41–43], suggesting then the importance of selection of more sensitive antigenic candidates to diagnosis the disease. In addition, individual peptides showed also lower sensitivity for the detection of CL and ML patients, when compared to the use of ChimLeish. Usually, short peptides present some problems to be used as diagnostic antigens for diseases, such as the limited adsorption on polystyrene plates, the low recognition by few specific antibodies, and the variable reproducibility according the clinical and immunological state of the disease [44,45]. In this context, the grouping of the selected antigenic fragments in chimeric proteins could presents higher diagnostic efficacy, such as visualized in this study.

Distinct immune response profiles are found according to the clinical manifestation of TL, and higher levels of antibodies are often described in the ML cases, when compared to CL patients [46]. In this context, a diagnostic kit presenting high sensitivity and specificity to diagnose CL and ML cases will be desirable, since this disease complex can cause a range of clinical manifestations in the patients, reaching from self-limiting lesions to mutilating scars. In addition, problems related to the available therapeutics, which are toxic and/or present high cost have been described [47,48]. *Leishmania* antigenic preparations have showed variable sensitivity and specificity values to diagnose TL, when sera of patients with Chagas Disease, leprosy, malaria, tuberculosis, histoplasmosis, aspergillosis, among others, or those HIV-infected, have been evaluated in the serological assays [49–52]. In fact, sera of patients developing such diseases, which present direct or indirect relation with

Table 1

Diagnostic evaluation of antigens for tegumentary leishmaniasis. Sera of healthy individuals living in endemic region of TL ( $n = 25$ ), as well as from patients with CL ( $n = 25$ ), ML ( $n = 30$ ), Chagas Disease ( $n = 25$ ), leprosy ( $n = 20$ ), histoplasmosis ( $n = 15$ ) and aspergillosis ( $n = 15$ ) or those HIV-infected ( $n = 15$ ) were used in ELISA against ChimLeish, synthetic peptides (Pept 1, Pept 2, Pept 3, Pept 4, Pept 5, Pept 6, Pept 7, and Pept 8) and SLA. The individual optical density (OD) values obtained for each antigen were used to construct ROC curves, and sensitivity (Se), specificity (Sp), area under the curve (AUC), confidence interval using a 95% level (95% CI), likelihood ratio (LR), and Youden index (Y) were calculated. Abbreviation: SLA- Soluble *L. braziliensis* Antigenic Extract.

Antigen	Se(%)	95%CI	Sp(%)	95%CI	AUC	95%CI	LR	Y	Cut-off
Pept 1	25.5	14.7–39.0	98.3	93.9–100	0.694	0.601–0.787	14.6	0.24	>0.562
Pept 2	29.1	17.6–42.9	99.1	95.3–100	0.708	0.615–0.802	33.5	0.28	>0.533
Pept 3	56.4	42.3–69.7	99.1	95.3–100	0.950	0.921–0.979	64.8	0.55	>0.529
Pept 4	47.3	33.7–61.2	99.1	95.3–100	0.796	0.715–0.878	54.4	0.46	>0.490
Pept 5	90.9	80.1–97.0	99.1	95.3–100	0.983	0.965–1.000	104.5	0.90	>0.444
Pept 6	43.6	30.3–57.7	99.1	95.3–100	0.927	0.888–0.966	50.2	0.43	>0.540
Pept 7	9.1	3.0–20.0	99.1	95.3–100	0.809	0.739–0.878	10.5	0.08	>0.584
Pept 8	23.6	13.2–37.0	99.1	95.3–100	0.775	0.701–0.849	27.2	0.23	>0.555
ChimLeish	100	93.5–100	100	95.3–100	1.000	1.000–1.000	115.0	0.99	>0.096
SLA	18.2	9.1–30.9	98.3	93.9–99.8	0.793	0.723–0.863	10.5	0.16	>0.545

the clinical and/or laboratorial diagnosis of TL, have been also used in other studies as cross-reactive disease groups, when distinct antigenic candidates are tested to detect TL [53–55]. In this context and according to the results found in this study, ChimLeish showed high sensitivity to be recognized by antibodies in sera of CL and ML patients, as well as high specificity due to the low reactivity against sera of cross-reactive diseases; suggesting then a diagnostic potential for this antigen in the TL. However, additional studies are certainly necessary to be performed, aiming to prove the high performance of ChimLeish for the TL diagnosis, as well as evaluating this antigen in other diagnostic platforms.

The antileishmanial serological follow-up of the patients after their treatment and clinical cure should be considered as an immunological control measure. However, antigens usually present similar or little variation in the post-therapy antibody follow-up, since OD values are similar to those found before treatment; suggesting then the absence of a relevant prognostic role [13,56–58]. Here, significantly lower levels of anti-ChimLeish IgG antibodies were found in sera of treated ML patients, when samples were collected six months post-therapy; suggesting then that the chimeric protein could be considered as an immunological candidate for the prognosis of disease. On the other hand, anti-SLA antibody levels were found to be similar before and after treatment, suggesting that this parasite antigenic preparation was not suitable to indicate the clinical cure of the patients. Similar results were also found by others, when SLA was evaluated as an antigen in serological follow-up after treatment against leishmaniasis [13,21,59]. Overall, our results can be considered interesting, mainly due to the fact that current diagnostic tests for leishmaniasis show variable sensitivity to monitor the treatment and clinic cure of patients, as well as to differentiate between past and active infections [20,28,60].

The sample size used in this study can be considered a limiting factor, as well as the absence of sera of patients with other clinical and/or laboratorial TL-related diseases. In addition, the serological follow-up of treated patients should also be performed for a longer period of time, aiming to prove the long-term prognostic efficacy of ChimLeish. Thus, present study's data can be taken as proof-of-concept of the capacity of this novel recombinant antigen to be applied for the diagnosis and prognosis of TL, and would serve as reference for future diagnostic studies, applied through the ELISA or in other diagnostic methods, such as immunochromatographic strips.

#### Financial support

This work was supported by grant MR/R005850/1 from the Medical Research Council (Vaccine development for complex intracellular neglected pATHogEns - VALIDATE), UK, and grant APQ-408675/2018–7 from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. The authors also thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the student scholarships.

#### CRedit authorship contribution statement

**Eduardo A.F. Coelho:** Conceptualization, Resources, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

#### Declaration of competing interest

The authors hereby declare that they have no conflicts of interest.

#### References

- [1] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, WHO Leishmaniasis Control Team, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One* 7 (5) (2012), e35671.
- [2] World Health Organization, Leishmaniasis. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>, 2018.
- [3] S. Burza, S.L. Croft, M. Boelaert, Leishmaniasis, *Lancet* 392 (10151) (2018 Sep 15) 951–970.
- [4] Grimaldi JrG, R.B. Tesh, Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research, *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (1993) 230–250.
- [5] H. Goto, J.A.L. Lindoso, Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, *Expert Rev. Anti Infect Ther* 8 (2010) 419–433.
- [6] C.X. Mello, M.F. Madeira, Skin scraping is the most accessible technique for the parasitological diagnosis of American tegumentary leishmaniasis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92 (5) (2015 May) 1082.
- [7] T.A. Barçante, M.V. Souza, A.C.B. Fernandes, J.M.P. Barçante, Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis, *An. Bras. Dermatol.* 94 (1) (2019 Jan-Feb) 113–114.
- [8] H. Goto, J.A. Lindoso, Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8 (4) (2010 Apr) 419–433.
- [9] A.L. Martins, J.A. Barreto, J.R. Lauris, A.C. Martins, American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters, *An. Bras. Dermatol.* 89 (1) (2014 Jan-Feb) 52–58.
- [10] B.L. Travi, A. Cordeiro-da-Silva, F. Dantas-Torres, G. Miró, Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 12 (1) (2018 Jan 11), e0006082.
- [11] J.M. Machado, L.E. Costa, D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, V.T. Martins, D.P. Lage, G. B. Carvalho, M.L. Franklin, G.S.V. Tavares, J.A. Oliveira-da-Silva, A.S. Machado, L. S. Ramos, L.M. Nogueira, R.M.S. Mariano, H.B. Moura, E.S. Silva, R.G. Teixeira-Neto, M. Campos-da-Paz, A.S. Galdino, E.A.F. Coelho, Diagnostic markers selected by immunoproteomics and phage display applied for the serodiagnosis of canine leishmaniasis, *Res. Vet. Sci.* 126 (2019 Oct) 4–8.
- [12] E.K. Elmahallawy, A. Sampedro Martinez, J. Rodriguez-Granger, Y. Hoyos-Mallecot, A. Agil, J.M. Navarro Mari, J. Gutierrez Fernandez, Diagnosis of leishmaniasis, *J. Infect. Dev. Ctries.* 8 (8) (2014 Aug 13) 961–972.
- [13] M.P. Lima, L.E. Costa, D.P. Lage, D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, A.S. Machado, F. F. Ramos, B.C.S. Salles, M.I. Fagundes, G.B. Carvalho, M.L. Franklin, M.A. Chávez-Fumagalli, R.A. Machado-de-Ávila, D. Menezes-Souza, M.C. Duarte, A.L. Teixeira, D.U. Gonçalves, E.A.F. Coelho, Diagnostic application of recombinant Leishmania proteins and evaluation of their in vitro immunogenicity after stimulation of immune cells collected from tegumentary leishmaniasis patients and healthy individuals, *Cell. Immunol.* 334 (2018 Dec) 61–69.
- [14] M.E. Bracamonte, A.M. Álvarez, A.M. Sosa, C.L. Hoyos, J.J. Lauthier, S.P. Cajal, M. Juárez, R.E. Uncos, F.J. Sánchez-Valdéz, L. Acuña, P. Diosque, M.A. Basombrío, J.R. Nasser, Y. Hashiguchi, M. Korenaga, P.A. Barroso, J.D. Marco, High performance of an enzyme linked immunosorbent assay for American tegumentary leishmaniasis diagnosis with Leishmania (Viannia) braziliensis amastigotes membrane crude antigens, *PLoS One* 15 (5) (2020 May 7), e0232829.
- [15] A.M. Fonseca, A.R. Faria, F.T. Rodrigues, R.A. Nagem, R.D. Magalhães, J.L. Cunha, D.C. Bartholomeu, H.M. de Andrade, Evaluation of three recombinant Leishmania infantum antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis, *Acta Trop.* 137 (2014 Sep) 25–30.
- [16] M.V. Humbert, L.E. Costa, I. Katis, F. Fonseca Ramos, A. Sánchez Machado, C. Soez, E.A. Ferraz Coelho, M. Christodoulides, A rapid diagnostic test for human visceral leishmaniasis using novel Leishmania antigens in a laser direct-write lateral flow device, *Emerg. Microb. Infect.* 8 (1) (2019) 1178–1185.
- [17] S.F. Carvalho, E.M. Lemos, R. Corey, R. Dietze, Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68 (3) (2003 Mar) 321–324.
- [18] R. Almeida-Paes, M.A. Pimenta, C.V. Pizzini, P.C. Monteiro, J.M. Peralta, J. D. Nosanchuk, R.M. Zancopé-Oliveira, Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection, *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (3) (2007 Mar) 244–249.
- [19] A.P. Souza, M. Soto, J.M. Costa, V.S. Boaventura, C.I. de Oliveira, J.R. Cristal, M. Barral-Netto, A. Barral, Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using Leishmania recombinant proteins, *PLoS One* 8 (6) (2013 Jun 12), e66110.
- [20] M.P. Lima, L.E. Costa, M.C. Duarte, D. Menezes-Souza, B.C.S. Salles, T.T. de Oliveira Santos, F.F. Ramos, M.A. Chávez-Fumagalli, A.C.S. Kursancew, R. P. Ambrósio, B.M. Roatt, R.A. Machado-de-Ávila, D.U. Gonçalves, E.A.F. Coelho, Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients, *Parasitol. Res.* 116 (4) (2017 Apr) 1197–1206.
- [21] D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, B.C.S. Salles, T.T.O. Santos, F.F. Ramos, D.P. Lage, L. E. Costa, A.S.B. Portela, G.B. Carvalho, M.A. Chávez-Fumagalli, R.B. Caligiorne, J. S. Oliveira, D.F. Magalhães-Soares, E.S. Silva, A.S. Galdino, D. Menezes-Souza, M. C. Duarte, D.U. Gonçalves, E.A.F. Coelho, Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved Leishmania hypothetical protein, *Parasitol. Int.* 67 (3) (2018 Jun) 344–350.
- [22] V.T.S. Coelho, J.S. Oliveira, D.G. Valadares, M.A. Chávez-Fumagalli, M.C. Duarte, P.S. Lage, M. Soto, M.M. Santoro, C.A. Tavares, A.P. Fernandes, E.A. Coelho, Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 6 (2012), e1430.
- [23] Á.S.B. Portela, L.E. Costa, B.C.S. Salles, M.P. Lima, T.T.O. Santos, F.F. Ramos, D. P. Lage, V.T. Martins, R.B. Caligiorne, D.R. Lessa, F.R. Silva, A.S. Machado, G. F. Nascimento, I.S. Gama, M.A. Chávez-Fumagalli, A.L. Teixeira, M.O.C. Rocha, R. L. Rocha, E.A.F. Coelho, Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis, *Immunobiology* 223 (3) (2018 Mar) 303–309.

- [24] D.P. Lage, V.T. Martins, M.C. Duarte, L.E. Costa, E. Garde, L.M. Dimer, A. C. Kursancew, M.A. Chávez-Fumagalli, D.F. de Magalhães-Soares, D. Menezes-Souza, B.M. Roatt, R.A. Machado-de-Ávila, M. Soto, C.A. Tavares, E.A. Coelho, 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.* 115 (4) (2016 Apr) 1649–1658.
- [25] V.T. Martins, M.C. Duarte, M.A. Chávez-Fumagalli, D. Menezes-Souza, C.S. Coelho, D.F. de Magalhães-Soares, A.P. Fernandes, M. Soto, C.A. Tavares, E.A. Coelho, 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, *Parasites Vectors* 8 (2015 Jul 11) 363.
- [26] E.A.F. Coelho, L. Ramirez, M.A.F. Costa, V.T.S. Coelho, V.T. Martins, M.A. Chávez-Fumagalli, D.M. Oliveira, C.A. Tavares, P. Bonay, C.G. Nieto, D.R. Abánades, C. Alonso, M. Soto, Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts, *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (2009) 1774–1780.
- [27] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3784–3788.
- [28] T.T.O. Santos, M.S. Cardoso, A.S. Machado, W.F. Siqueira, F.F. Ramos, J. A. Oliveira-da-Silva, G.S.V. Tavares, D.P. Lage, L.E. Costa, C.S. de Freitas, V. T. Martins, R.S. Bandeira, M.A. Chávez-Fumagalli, S. Lyon, R.L.F. Moreira, D.F. de Magalhães-Soares, J.A.G. Silveira, U. Tupinambás, R.B. Caligiorno, A.T. Chaves, M. O.C. Rocha, R.T. Fujiwara, E.A.F. Coelho, Recombinant *Leishmania* eukaryotic elongation factor-1 beta protein: a potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans, *Microb. Pathog.* 137 (2019 Dec) 103783.
- [29] R.C.F. Brito, R.D.O. Aguiar-Soares, J.M.O. Cardoso, W. Coura-Vital, B.M. Roatt, A. B. Reis, Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (19) (2020 Oct) 8105–8116.
- [30] A. Ricciardi, M. Ndao, Diagnosis of parasitic infections: what's going on? *J. Biomol. Screen* 20 (1) (2015 Jan) 6–21.
- [31] F.A. Carvalho, H. Charest, C.A. Tavares, G. Matlashewski, E.P. Valente, A. Rabello, R.T. Gazzinelli, A.P. Fernandes, Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43 (4) (2002 Aug) 289–295.
- [32] Z. Rezaei, G. Pouladfar, A. Ramezani, Z. Mostafavi-Pour, A. Abbasian, B. Sarkari, B. Pourabbas, Importance of *L. infantum* H2B recombinant antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis, *Iran. J. Immunol.* 16 (4) (2019 Dec) 311–320.
- [33] A.S. Machado, F.F. Ramos, T.T.O. Santos, L.E. Costa, F. Ludolf, D.P. Lage, R. S. Bandeira, G.S.V. Tavares, J.A. Oliveira-da-Silva, B.T. Steiner, A.T. Chaves, J. S. Oliveira, M.A. Chávez-Fumagalli, D.F. de Magalhães-Soares, J.A.G. Silveira, M. C. Duarte, R.A. Machado-de-Ávila, S. Lyon, D.U. Gonçalves, R.B. Caligiorno, E.A. F. Coelho, A new *Leishmania* hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease, *Exp. Parasitol.* 216 (2020 Sep) 107941.
- [34] A.P.O. Mendes, B.C. Oliveira, A.M.S. Pereira, M.C.A.B. Castro, M.A. Souza, M.E. F. Brito, F.F. Araújo, A. Teixeira-Carvalho, O.A. Martins-Filho, V.R.A. Pereira, American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L. (V.) braziliensis* fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification, *BMC Infect. Dis.* 19 (1) (2019 Nov 29) 1015.
- [35] F.B. Magalhães, A.L. Castro Neto, M.B. Nascimento, W.J.T. Santos, Z.M. Medeiros, A.S.A.S. Lima Neto, et al., Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis, *PLoS One* 12 (2017), e0184867. Brito RCF, Aguiar-Soares RDO, Cardoso JMO, Coura-Vital W, Roatt BM, Reis AB. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Oct;104(19):8105-8116.
- [36] W.J.T. Santos, D.H.C. Tavares, A.L. Castro Neto, M.B. Nascimento, R. Dhalia, A. L. Albuquerque, C.H.N. Costa, F.B. Magalhães, A.M. Rezende, O.P. de Melo Neto, Gene design, optimization of protein expression and preliminary evaluation of a new chimeric protein for the serological diagnosis of both human and canine visceral leishmaniasis, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 14 (7) (2020 Jul 27), e0008488.
- [37] L.C. Valli, V.M. Passos, R. Dietze, H.L. Callahan, J.D. Berman, M. Grog, Humoral immune responses among mucosal and cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*, *J. Parasitol.* 85 (6) (1999 Dec) 1076–1083.
- [38] B. Sarkari, M. Ashrafmansouri, G. Hatam, P. Habibi, S. Abdolahi Khabisi, Performance of an ELISA and indirect immunofluorescence assay in serological diagnosis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran, *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* (2014) 505134, 2014.
- [39] M.C. Duarte, D.C. Pimenta, D. Menezes-Souza, R.D. Magalhães, J.L. Diniz, L. E. Costa, M.A. Chávez-Fumagalli, P.S. Lage, D.C. Bartholomeu, M.J. Alves, A. P. Fernandes, M. Soto, C.A. Tavares, D.U. Gonçalves, M.O. Rocha, E.A. Coelho, Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis, *Clin. Vaccine Immunol.* 22 (11) (2015 Nov) 1187–1196.
- [40] C.M. Sato, M.C. Sanchez, B.J. Celeste, M.S. Duthie, J. Guderian, S.G. Reed, M.E. de Brito, M.B. Campos, H.V. de Souza Encarnação, J. Guerra, T.G. de Mesquita, S. K. Pinheiro, R. Ramasawmy, F.T. Silveira, M. de Assis Souza, H. Goto, Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different *Leishmania* species, *J. Clin. Microbiol.* 55 (2) (2017 Feb) 495–503.
- [41] E.A. Coelho, L.E. Costa, D.P. Lage, V.T. Martins, E. Garde, N.C. de Jesus Pereira, E. G. Lopes, L.F. Borges, M.C. Duarte, D. Menezes-Souza, D.F. de Magalhães-Soares, M.A. Chávez-Fumagalli, M. Soto, C.A. Tavares, 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.* 215 (2016 Jan 15) 63–71.
- [42] P.A.F. Ribeiro, D.S. Dias, D.P. Lage, L.E. Costa, B.C.S. Salles, B.T. Steiner, F. F. Ramos, M.P. Lima, T.T.O. Santos, A.T. Chaves, M.A. Chávez-Fumagalli, R. T. Fujiwara, L.L. Bueno, R.B. Caligiorno, D.F. de Magalhães-Soares, J.A.G. Silveira, R.A. Machado-de-Ávila, D.U. Gonçalves, E.A.F. Coelho, A conserved *Leishmania* hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 92 (3) (2018 Nov) 196–203.
- [43] B.C.S. Salles, D.S. Dias, B.T. Steiner, D.P. Lage, F.F. Ramos, P.A.F. Ribeiro, T.T. O. Santos, M.P. Lima, L.E. Costa, A.T. Chaves, M.A. Chávez-Fumagalli, R. T. Fujiwara, L.L. Bueno, R.B. Caligiorno, D.F. de Magalhães-Soares, J.A. G. Silveira, R.A. Machado-de-Ávila, D.U. Gonçalves, E.A.F. Coelho, Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis, *Immunobiology* 224 (1) (2019 Jan) 163–171.
- [44] M.J. Gómara, I. Haro, Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases, *Curr. Med. Chem.* 14 (5) (2007) 531–546.
- [45] D.P. Lage, V.T. Martins, M.C. Duarte, L.E. Costa, E. Garde, L.M. Dimer, A. C. Kursancew, M.A. Chávez-Fumagalli, D.F. de Magalhães-Soares, D. Menezes-Souza, B.M. Roatt, R.A. Machado-de-Ávila, M. Soto, C.A. Tavares, E.A. Coelho, 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.* 115 (4) (2016 Apr) 1649–1658.
- [46] M.L. Freire, F.D. Rego, G. Cota, M.A. Pascoal-Xavier, E. Oliveira, Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: a systematic review, *PLoS One* 16 (5) (2021 May 27), e0251956.
- [47] V. Yardley, N. Ortuno, A. Llano-Cuentas, F. Chappuis, S.D. Doncker, L. Ramirez, S. Croft, J. Arevalo, V. Adauí, H. Bermudez, S. Decuyper, J.C. Dujardin, American tegumentary leishmaniasis: is antimicrobial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J. Infect. Dis.* 194 (8) (2006 Oct 15) 1168–1175.
- [48] S.C. Silva, L.H. Guimarães, J.A. Silva, V. Magalhães, L. Medina, A. Queiroz, P.R. L. Machado, A. Schriefer, Molecular epidemiology and in vitro evidence suggest that *Leishmania braziliensis* strain helps determine antimony response among American tegumentary leishmaniasis patients, *Acta Trop.* 178 (2018 Feb) 34–39.
- [49] G.A.S. Romero, M. de la GO. Orge, M.V. de F Guerra, M.G. Paes, V. de O Macêdo, E. M. de Carvalho, Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil, *Acta Trop.* 93 (2005) 49–56.
- [50] Z.C. Caballero, O.E. Sousa, W.P. Marques, A. Saez-Alquezar, E.S. Umezawa, Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp, *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (2007) 1045–1049.
- [51] D. Menezes-Souza, T.A. De Oliveira Mendes, R.A. Pinto Nagem, T.T. De Oliveira Santos, A.L. Teixeira Silva, M.M. Santoro, et al., Mapping B-cell epitopes for the peroxidase of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis, *PLoS One* 9 (2014).
- [52] D.P. Lage, A.S. Machado, F.F. Ramos, P.C. Silveira, D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, et al., A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant *Leishmania* hypothetical protein, *Immunobiology* 224 (2019) 477–484.
- [53] Y. Montoya, C. Leon, M. Talledo, O. Nolasco, C. Padilla, U. Muñoz-Najar, D. C. Barker, Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91 (6) (1997 Nov-Dec) 674–676.
- [54] P.A.F. Ribeiro, D.S. Dias, D.P. Lage, L.E. Costa, B.C.S. Salles, B.T. Steiner, F. F. Ramos, M.P. Lima, T.T.O. Santos, A.T. Chaves, M.A. Chávez-Fumagalli, R. T. Fujiwara, L.L. Bueno, R.B. Caligiorno, D.F. de Magalhães-Soares, J.A.G. Silveira, R.A. Machado-de-Ávila, D.U. Gonçalves, E.A.F. Coelho, A conserved *Leishmania* hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 92 (3) (2018 Nov) 196–203.
- [55] L.M.B. Souza, J. Carvalho, M.D. Bates, R.R. Petteerle, V. Thomaz-Soccol, P.A. Bates, Production of a kinesin-related recombinant protein (Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis, *One Health* 8 (2019 Oct 31) 100111.
- [56] G.M. Viana, M.D. Nascimento, J.A. Diniz Neto, E.M. Rabelo, J.R. Binda Júnior, O. M. Santos Júnior, A.C. Santos, C.S. Galvão, R.S. Guimarães, Anti-*Leishmania* titers and positive skin tests in patients cured of kala-azar, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44 (1) (2011 Jan) 62–65.
- [57] I. Reiter-Owona, C. Rehkaemper-Schaefer, S. Arriens, P. Rosenstock, K. Pfarr, A. Hoerauf, Specific K39 antibody response and its persistence after treatment in patients with imported leishmaniasis, *Parasitol. Res.* 115 (2) (2016 Feb) 761–769.
- [58] A.C. Vallur, A. Hailu, D. Mondal, C. Reinhart, H. Wondimu, Y. Tutterrow, H. W. Ghalib, S.G. Reed, M.S. Duthie, Specific antibody responses as indicators of



N.C. Galvani et al.

*Microbial Pathogenesis* 162 (2022) 105341

- treatment efficacy for visceral leishmaniasis, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (4) (2015 Apr) 679–686.
- [59] G.A. Fagundes-Silva, R. Vieira-Goncalves, M.P. Nepomuceno, M.A. de Souza, S. Favoreto Jr., M.P. Oliveira-Neto, A.M. Da-Cruz, A. Gomes-Silva, Decrease in anti-Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure, *Parasite Immunol.* 34 (10) (2012 Oct) 486–491.
- [60] T.T.O. Santos, F.F. Ramos, I.A.P. Gonçalves, G.S.V. Tavares, F. Ludolf, R. S. Bandeira, A.M. Silva, J.A. Oliveira-da-Silva, T.A.R. Reis, A.S. Machado, D. P. Lage, C.S. Freitas, D.L. Vale, V.T. Martins, L.A. Alves, N.S. Guimarães, A. T. Chaves, M.A. Chávez-Fumagalli, G.F. Cota, J.A.G. Silveira, U. Tupinambás, D. U. Gonçalves, M. Christodoulides, E.A.F. Coelho, Potential of recombinant LiHyQ, a novel *Leishmania infantum* protein, for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and as a diagnostic and prognostic marker for human leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection: a preliminary study, *Acta Trop.* 224 (2021 Sep 16) 106126.

#### 6.4 Conclusão do artigo 2

Neste artigo científico, foi possível concluir que a proteína quimera *ChimLeish* destacou-se quanto ao seu potencial diagnóstico e prognóstico em plataformas sorológicas de LT. A nova proteína apresentou elevados índices de especificidade e sensibilidade, quando comparada também a outros antígenos como a SLA de *L. braziliensis*. Conseguiu ainda, diferenciar amostras de indivíduos infectados com LT de amostras de pacientes infectados por outras doenças de possível reação cruzada como doença de chagas, hanseníase, histoplasmose, aspergilose e HIV.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos considerar que os peptídeos de células B preditos por bioinformática, assim como a proteína quimérica proveniente, demonstraram-se eficazes frente a uma plataforma sorológica de amostras de pacientes infectados com LV, LV/HIV e LT. Os antígenos demonstraram uma elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LV, coinfeção por LV/HIV e LT, destacando-se principalmente a proteína quimérica denominada de *ChimLeish* apresentando 100% de especificidade e sensibilidade. Os peptídeos individuais também demonstraram potencial diagnóstico com eficácia elevada, destacando-se os peptídeos 1, 3 e 6 frente a LV e LV/HIV e o peptídeo 5 frente a LT. Os peptídeos individuais, destacaram-se principalmente frente a uma plataforma de amostras de LV e coinfeção LV/HIV, indicando novas possibilidades a serem estudadas na aplicação de futuros testes diagnósticos. A proteína quimérica demonstrou ainda ser um importante marcador prognóstico, permitindo diferenciar pacientes com a infecção ativa por diferentes Leishmanioses, daqueles tratados e curados clinicamente.

Nossos resultados aqui apresentados, indicam importantes novos marcadores com potencial diagnóstico e prognóstico frente às leishmanioses, visando suprir os principais pontos de limitação que norteiam essas doenças. É importante ressaltar, a necessidade de mais estudos com plataformas que apresentem um maior número de amostras para ambas as doenças e critérios aqui avaliados, e maior atenção quanto a detecção da avaliação prognóstica, no qual necessita de um acompanhamento por um período maior nos pacientes em tratamento.

Independente das limitações encontradas, conclui-se dentre os principais resultados obtidos, que a utilização de ferramentas de bioinformática aplicadas a métodos de predição de novos antígenos, demonstram uma capacidade inovadora no desenvolvimento de novos e importantes produtos biológicos, frente a doenças infecciosas de preocupação a Saúde Pública, como é o caso das leishmanioses. Por fim, os métodos aplicados nesta tese permitiram obter um importante conjunto de antígenos originando a proteína quimérica *ChimLeish*, onde demonstraram um bom desempenho como marcadores diagnósticos e prognósticos, que possam ser futuramente aperfeiçoados e aplicados em testes de imunodiagnóstico, assim como implementados em futuras tiras imunocromatográficas.

## **8 PERSPECTIVAS**

- Incorporar a quimera recombinante em fitas imunocromatográficas para verificação da possibilidade de se desenvolver um teste rápido.
- Testar os protótipos desenvolvidos em condições de campo com maior volume amostral dos grupos aqui avaliados.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. v. 9, 2019.
- AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune Responses Associated with Susceptibility of C57BL/10 Mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2952–2959, 1993.
- AKHOUNDI, M. et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29, 1 out. 2017.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 3, p. 244–249, mar. 2007.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic Local Alignment Search Tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334–359, abr. 2008.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 31 maio 2012.
- ANAND, A. et al. *Leishmania donovani* induces CD300a expression to dampen effector properties of CD11c<sup>+</sup> dendritic and antigen activated CD8<sup>+</sup> T cells. **Acta Tropica**, v. 239, 1 mar. 2023.
- ASSIS, L. H. C. et al. Cell cycle, telomeres, and telomerase in *leishmania* spp.: What do we know so far? **Cells**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2021.
- ASSIS, T. M.; RABELLO, A.; COTA, G. Economic evaluations addressing diagnosis and treatment strategies for neglected tropical diseases: an overview. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v. 63, 2021.
- ASSOUAB, A.; EL FILALY, H.; AKARID, K. Inhibiting Human and *Leishmania* Arginases Using *Cannabis sativa* as a Potential Therapy for Cutaneous Leishmaniasis: A Molecular Docking Study. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 12, 1 dez. 2022.
- ÁVILA, I. R. et al. Occurrence of human visceral leishmaniasis in the Central-West region of Brazil: A systematic review. **Acta Tropica**, v. 237, p. 106707, jan. 2023.
- AZZAM, R. et al. Impaired Complement-Mediated Phagocytosis by HIV Type-1-Infected Human Monocyte-Derived Macrophages Involves a cAMP-Dependent Mechanism. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 22, n. 7, p. 619–629, 2006.
- BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 767–811, 2000.

BARÇANTE, T. A. et al. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **An. Bras. Dermatol**, v. 94, n. 1, p. 105–21, 2019.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175–196, dez. 2012.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, ago. 2007.

BEIL, W. J., ET AL. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 52, n. 2, p. 135–142, 1992.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 684–703, 1997.

BLAINEAU, C. et al. A Novel Microtubule-Depolymerizing Kinesin Involved in Length Control of a Eukaryotic Flagellum. **Current Biology**, v. 17, n. 9, p. 778–782, 2007.

BOGDAN, C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. **Cytokine: X**, v. 2, n. 4, 1 dez. 2020.

BRACAMONTE, M. E. et al. High performance of an enzyme linked immunosorbent assay for American tegumentary leishmaniasis diagnosis with *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes membrane crude antigens. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, 1 maio 2020.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Crop Journal**, v. 5, n. 5, p. 407–415, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral: Diagnóstico**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral#:~:text=da%20Leishmaniose%20Visceral.-,Diagn%C3%B3stico,que%20surgiram%20os%20primeiros%20sintomas>>. Acesso em: 06 de novembro de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde; Secretária de vigilância em saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV**. [s.l.] Editora MS, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde; Secretária de vigilância em saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Leishmania*-HIV**. [s.l.] Editora MS, v. 49, 2004.

BURKI, T.; ZWIZWAI, R. Guidelines for visceral leishmaniasis and HIV co-infection. **Clinical Infectious Diseases**, 11 fev. 2022.

CAVALCANTE, T. et al. The Role of Sialic Acids in the Establishment of Infections by Pathogens, With Special Focus on Leishmania. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–13, 2021.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, 1 dez. 2022.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. Sensitive and specific serodiagnosis of Leishmania infantum infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 931–944, 2013.

COELHO, E. A. F. et al. Immune responses induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, 1 jul. 2003.

COELHO, E. A. F. et al. Evaluation of two recombinant Leishmania proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 63–71, 15 jan. 2016.

COELHO, V. T. S. et al. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like Leishmania using an immunoproteomic approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2012.

COSTA, R. et al. HIV: Mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 8, p. 1743–1755, 2010.

COTA, G. F. et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: A cross-sectional delayed-type study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 570–577, 2013.

COUKELL, A. J.; BROGDEN, R. N.; BERMAN, J. Liposomal Amphotericin B Therapeutic Use in the Management of Fungal Infections and Visceral Leishmaniasis. **Drug**, v. 55, n. 4, p. 585–612, 1998.

COURA-VITAL, W. et al. Risk Factors for Seroconversion by Leishmania infantum in a Cohort of Dogs from an Endemic Area of Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: Epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, n. SUPPL. 1, out. 2003.

DHOM-LEMONS, L. et al. Leishmania infantum recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2019.

DIAS, D. S. et al. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. **Parasitology International**, v. 67, n. 3, p. 344–350, 1 jun. 2018.

DIAS, D. S. et al. rMELEISH: A Novel Recombinant Multi-epitope-Based Protein Applied to the Serodiagnosis of Both Canine and Human Visceral Leishmaniasis. **Pathogens**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2023.

DIDWANIA, N. et al. Evaluation of cysteine protease c of *Leishmania donovani* in comparison with glycoprotein 63 and elongation factor 1 $\alpha$  for diagnosis of human visceral leishmaniasis and for posttreatment follow-up response. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 11, 1 nov. 2020.

DIRO, E. et al. Use of Pentamidine As Secondary Prophylaxis to Prevent Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV Infected Patients, the First Twelve Months of a Prospective Cohort Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, 2 out. 2015.

DUARTE, M. C. et al. Performance of *Leishmania braziliensis* enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 77–81, 30 abr. 2017.

DYBUL, M. et al. The case for an HIV cure and how to get there. **The Lancet**, v. 8, n. 1, p. 51–58, 1 jan. 2021.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 961–972, 2014.

EMINI, E. A. et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, v. 55, n. 3, p. 836–839, 1985.

EYAYU, T. et al. Evaluation of urine sample for diagnosis of visceral leishmaniasis using rK-39 immunochromatographic test in Northwest Ethiopia. **PLoS ONE**, v. 17, n. 2 February, 1 fev. 2022.

FAKHRY, Y. EL; QUELLETE, M.; PAPADOPOULOU, B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v. 2, p. 1007–1017, 2002.

FARAHMAND, M.; NAHREVANIAN, H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. **Iranian Biomedical Journal**, v. 20, n. 3, p. 128–134, 2016.

FERNANDES, A. P. et al. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: Rational, update and perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 476–485, ago. 2012.

FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A.; VASTA, G. R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 5, p. 244–254, 2010.



FERRAZ, I. DE A. et al. Development of an immunogen containing CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes for the prophylaxis of tegumentary leishmaniasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 12, p. 4627–4641, 1 jun. 2022.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Chemoinformatics strategies for leishmaniasis drug discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, 1 nov. 2018.

FILIFE-SANTOS, O. et al. A Dynamic Map of Antigen Recognition by CD4 T Cells at the Site of *Leishmania major* Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 6, n. 1, p. 23–33, 2009.

FONSECA, A. M. et al. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v. 137, p. 25–30, 2014.

FREITAS MESQUITA, A. L.; DOS SANTOS, A. L. A.; MEYER FERNANDES, J. R. Involvement of *Leishmania* Phosphatases in Parasite Biology and Pathogeny. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–10, 2021.

GANGULI, P. et al. Identification of Th1/Th2 regulatory switch to promote healing response during leishmaniasis: a computational approach. **Eurasip Journal on Bioinformatics and Systems Biology**, v. 2015, n. 1, p. 1–19, 1 dez. 2015.

GARCIA, G. C. et al. Development of a chimeric protein based on a proteomic approach for the serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 18, p. 6805–6817, 1 set. 2021.

GARG, R.; TRUDEL, N.; TREMBLAY, M. J. Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 7, p. 317–324, 2007.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–607, 2005.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONZÁLEZ, U. et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2015, n. 8, 5 ago. 2015.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int. J. Parasitol.**, v. 15, n. 33, p. 1027–1034, set. 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2014.

GOYAL, D. K.; KESHAV, P.; KAUR, S. Microbial Pathogenesis Potential of TLR agonist as an adjuvant in Leishmania vaccine against visceral leishmaniasis in BALB / c mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, n. May, p. 105021, 2021.

GRAEPP-FONTOURA, I. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Brazil: epidemiological profile and spatial patterns. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 11 out. 2022.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1169–1180, out. 2005.

GRIMALDI, J. G.; TESH, B. R. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

GUIMARÃES, M.C.S. Exames de laboratório: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.18, n.2, 1985.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of Leishmania with the host macrophage. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.

gHUMBERT, M. V. et al. A rapid diagnostic test for human Visceral Leishmaniasis using novel Leishmania antigens in a Laser Direct-Write Lateral Flow Device. **Emerging Microbes and Infections**, v. 8, n. 1, p. 1178–1185, 1 jan. 2019.

IHME. **Institute for Health Metrics and Evaluation IHME HIV Atlas**. Disponível em: <<https://www.healthdata.org/data-visualization/hiv-atlas>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1–12, 2015.

JAWALE, D.; KHANDIBHARAD, S.; SINGH, S. Decoding systems immunological model of sphingolipids with IL-6/IL-17/IL-23 axes in L. major infection. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1868, n. 2, 1 fev. 2023.

KARIMI KAKH, M. et al. Application of the Leishmania infantum 21-kDa recombinant protein for the development of an immunochromatographic test. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 10, 1 out. 2020.

KEDZIERSKA, K. et al. Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, p. 247–263, 2003.

KEDZIERSKA, K.; CROWE, S. M. The Role of Monocytes and Macrophages in the Pathogenesis of HIV-1 Infection. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1893, 2002.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1544–1562, 2014.

KOZLOVA, E. E. G. et al. Classification epitopes in groups based on their protein family. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 19, 16 dez. 2015.

KROPF, P. et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 8, p. 1000–1002, jun. 2005.

LAGE, D. P. et al. Prophylactic properties of a *Leishmania*-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 12, p. 646–656, 1 dez. 2015.

LAGE, D. P. et al. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, p. 1649–1658, 2016a.

LAGE, D. P. et al. Cross-protective efficacy of *Leishmania infantum* LiHyD protein against tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* species. **Acta Tropica**, v. 158, p. 220–230, 1 jun. 2016b.

LÉVÊQUE, M.F.; et al. Place of Serology in the Diagnosis of Zoonotic Leishmaniases With a Focus on Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum*. **Rev. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, 2020.

LIMA, Á. L. M. et al. Changing epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: A 25-year follow-up of an urban outbreak. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 111, n. 10, p. 440–447, 2017.

LIMA, M. P. et al. Diagnostic application of recombinant *Leishmania* proteins and evaluation of their in vitro immunogenicity after stimulation of immune cells collected from tegumentary leishmaniasis patients and healthy individuals. **Cellular Immunology**, v. 334, p. 61–69, 1 dez. 2018.

LINDOSO, J. A. L. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 10, p. 193–201, 2018.

MACHADO, A. S. et al. A new *Leishmania* hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease. **Experimental Parasitology**, v. 216, n. July, p. 107941, 2020a.

MACHADO, A. S. et al. A *Leishmania infantum* hypothetical protein evaluated as a recombinant protein and specific B-cell epitope for the serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 203, 1 mar. 2020b.

MACHADO DE AVILA, R. A. et al. Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1640–1646, 2011.

MACHADO, J. M. et al. Proof of Concept of a Novel Multiepitope Recombinant Protein for the Serodiagnosis of Patients with Chagas Disease. **Pathogens**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2023.

MADUSANKA, R. K.; SILVA, H.; KARUNAWEEERA, N. D. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis and Insights into Species-Specific Responses: A Narrative Review. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 11, n. 2, p. 695–711, 1 abr. 2022.

MAKSOURI, H. et al. Moroccan strains of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* differentially impact on nitric oxide production by macrophages. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, 23 out. 2017.

MANDAL, G. et al. Species-Specific Antimonial Sensitivity in *Leishmania* Is Driven by Post-Transcriptional Regulation of AQP1. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, 2015.

MARTINS, A. L. G. P. et al. American tegumentary leishmaniasis: Correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 52–58, 2014.

MARTINS, V. T. et al. 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. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2015.

MARTINS, V. T. et al. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein, LiHyT, used as a vaccine antigen against visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 154, p. 73–81, 1 fev. 2016a.

MARTINS, V. T. et al. Cross-protective efficacy from a immunogen firstly identified in *Leishmania infantum* against tegumentary leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 2, p. 108–117, 1 fev. 2016b.

MELLO, C. X.; MADEIRA, M. DE F. Skin Scraping is the Most Accessible Technique for the Parasitological Diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 5, p. 1082, 2015.

MEDEIROS, R. M.T.E. et al. Mapping linear B-cell epitopes of the Tryparedoxin Peroxidase and its implications in the serological diagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.232, 2022.

MENDES, T. M. et al. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Vaccine**, v. 31, n. 25, p. 2749–2755, 7 jun. 2013.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, v. 32, p. 221–296, 1969.

MIRALLES, G. D. et al. Th1 and Th2 Cell-Associated Cytokines in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 1058–1063, 1994.

MOHAN, S. et al. Estimating the global demand curve for a leishmaniasis vaccine: A generalisable approach based on global burden of disease estimates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 6, 1 jun. 2022.

MOREAU, V. et al. PEPOP: Computational design of immunogenic peptides. **BMC Bioinformatics**, v. 9, 30 jan. 2008.

MOREIRA, E. D. et al. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine Leishmania transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 245–252, 6 ago. 2004.

MUXEL, S. M. et al. Arginine and polyamines fate in Leishmania infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 15 jan. 2018.

NEVES, D. P.; et al. **PARASITOLOGIA HUMANA**. 13<sup>o</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. **Immunologic Research**, v. 56, n. 1, p. 163–171, maio 2013.

OLIVEIRA, M. et al. Intoxicação por ingestão de coleira antiparasitária em cão: Relato de caso. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 30, 15 dez. 2019.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe epidemiológico da Américas**. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>>. Núm. 10, dezembro de 2021.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **Infográfico: Leishmaniose visceral. Américas - 2018**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/documentos/infografico-leishmaniose-visceral-americas-2018>>. Acesso em: 15 out. 2022.

PAHO, Pan American Health Organization. **Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas**. Disponível em: <[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34856/LeishReport6\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34856/LeishReport6_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Fev, 2018.

PAHO, Pan American Health Organization. **Interactive Atlas of Leishmaniasis in the Americas: Clinical Aspects and Differential Diagnosis**. Washington, 2020.

PAHO, Pan American Health Organization. **Neglected tropical diseases: PAHO calls for an end to delays in treatment in the Americas**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/28-1-2022-doencas-tropicais-negligenciadas-opas-pede-fim-dos-atrasos-no-tratamento-nas>>. Acesso em: 8 out. 2022a.

PAHO, Pan American Health Organization. **Visceral Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/visceral-leishmaniasis>>. Acesso em: 14 out. 2022b.

PAHO, Pan American Health Organization. **Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/cutaneous-and-mucosal-leishmaniasis>>. Acesso em: 14 out. 2022c.

PAHO, Pan American Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 14 out. 2022d.

PAHO, Pan American Health Organization. **HIV/aids**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/hivaid>>. Acesso em: 28 out. 2022e.

PAHO, Pan American Health Organization. **Leishmaniasis: PAHO publishes updated treatment guidelines for the Americas**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/news/5-8-2022-leishmaniasis-paho-publishes-updated-treatment-guidelines-americas>>. Acesso em: 15 out. 2022f.

PAHO, Pan American Health Organization. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.

PORTELA, Á. S. B. et al. Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 223, n. 3, p. 303–309, 2018.

PRADHAN, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516–521, 1 mar. 2022.

QUEIROZ, I. T.; LUZ, K. G. Terapia combinada na coinfeção LV/HIV. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102298, jan. 2022.

RAMOS, R. E. M. et al. Assessment of a recombinant protein from *Leishmania infantum* as a novel tool for Visceral Leishmaniasis (VL) diagnosis in VL/HIV co-infection cases. **Plos One**, v. 16, n. 5, 2021.

REITER-OWONA, I. et al. Specific K39 antibody response and its persistence after treatment in patients with imported leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 761–769, 1 fev. 2016.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21–25, jan. 2007.

REZAEI, Z; POURABBAS, B; KÜHNE, V; POURABBAS, P; BÜSCHER. Diagnostic Performance of Three Rk39 Rapid Diagnostic Tests and Two Direct Agglutination Tests for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Southern Iran. **Trop. Med**, 2022.

RIBEIRO, P. A. F. et al. A conserved *Leishmania* hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 3, p. 196–203, 1 nov. 2018.

ROBERTS, S. C. et al. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*: Characterization of gene deletion mutants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23668–23678, 28 maio 2004.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. AlgPred: Prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 202–209, 2006.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **J Vector Borne Dis.**, v. 53, p. 8–16, 2016.

SALLES, B. C. S. et al. *Leishmania infantum* mimotopes and a phage–ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 3, p. 219–225, 2017.

SALLES, B. C. S. et al. Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 224, n. 1, p. 163–171, 1 jan. 2019.

SANTOS, T. T. O. et al. Recombinant *Leishmania* eukaryotic elongation factor-1 beta protein: A potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, 1 dez. 2019.

SANTOS, T. T. O. et al. Potential of recombinant LiHyQ, a novel *Leishmania infantum* protein, for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and as a diagnostic and prognostic marker for human leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection: A preliminary study. **Acta Tropica**, v. 224, 1 dez. 2021.

SARKARI, B.; REZAEI, Z.; MOHEBALI, M. Immunodiagnosis of visceral leishmaniasis: Current status and challenges: A review article. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 13, n. 3, p. 331–341, 2018.

SASIDHARAN, S.; PRAKASH SAUDAGAR, &. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Protozoology**, v. 120, p. 1541–1554, 2021.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCHALLIG, H. D. F. H.; OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 8, p. 641–651, 2002.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

SCUSSEL, R. et al. Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. **ACS Applied Nano Materials**, v. 5, n. 1, p. 642–653, 28 jan. 2022.

SHIRZADI, M. R. Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 10, p. 11–18, abr. 2019.

SILVA, S. C. et al. Molecular epidemiology and in vitro evidence suggest that *Leishmania braziliensis* strain helps determine antimony response among American tegumentary leishmaniasis patients. **Acta Trop.**, v. 178, p. 34–39, 2018.

SINAN. Sistema de informações de agravos de notificações **Leishmaniose Visceral - Casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Brasil**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>. 2019.

SOARES, B. A. et al. Epitope mapping from *Mycobacterium leprae* proteins: Convergent data from in silico and in vitro approaches for serodiagnosis of leprosy. **Molecular Immunology**, v. 138, p. 48–57, 1 out. 2021.

SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1065–1078, mar. 2012.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M. **Bioquímica**. Ed. Guanabara Koogan S.A. v. 5, 2004.

SUNDAR, S.; SINGH, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis and Therapy**, v. 22, n. 4, p. 443–457, 1 ago. 2018.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, v. 3, n. 5, p. 657–667, 2003.

TESH RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 52, n. 3, p. 287–92, 1995.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253–272, 1 jun. 2020.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2018.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: Paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.

UNAIDS, United Nations Political Declaration on HIV and AIDS. **UNAIDS DATA 2019**. Geneva, 2019.



UNAIDS, United Nations Political Declaration on HIV and AIDS. **Estatísticas globais sobre HIV**. Disponível em: <<https://unaid.org.br/2023/05/o-unaid-alerta-para-uma-oportunidade-unica-de-interromper-novas-infeccoes-por-hiv-acabar-com-a-aids-e-se-preparar-para-futuras-pandemias/>>. Acesso em: 29 de maio de 2023.

VALE, D.L. et al. Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic *Leishmania infantum* proteins. **Veterinary Parasitology**, v. 296, 2021.

VALE, D. L. et al. Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 167, 1 jun. 2022.

VALLUR, A. C. et al. Biomarkers for intracellular pathogens: Establishing tools as vaccine and therapeutic endpoints for visceral leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, 2014.

VANLOUBBEECK, Y.; JONES, D. E. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 267–272, 2004.

VILELA DE SOUZA, M. et al. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **An Bras Dermatol**, v. 94, n. 1, p. 105–21, 2019.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 191–200, 1 mar. 2015.

WHO, World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Geneva, 22-26 March 2010.

WHO, World Health Organization. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: A road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Geneva, 2020.

WHO, World Health Organization. **Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. Accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact**. Geneva, 2021.

WHO, World Health Organization. **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2020**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: 14 out. 2022a.

WHO, World Health Organization. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2020**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: 14 out. 2022b.

WHO, World Health Organization. **Global distribution of leishmaniasis and countries reporting HIV/*Leishmania* coinfection, 2020**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: 14 out. 2022c.

WHO, World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: 14 out. 2022d.

WHO, World Health Organization. **HIV**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/hiv-aids/#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/hiv-aids/#tab=tab_1)>. Acesso em: 28 out. 2022e.


WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147–160, 2005.

YASMIN, H. et al. Host–Pathogen Interaction in Leishmaniasis: Immune Response and Vaccination Strategies. **Immuno**, v. 2, n. 1, p. 218–254, 9 mar. 2022.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 2, p. 108–113, 2001.

## 10 ANEXOS

10.1 Certificado de aprovação do projeto junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

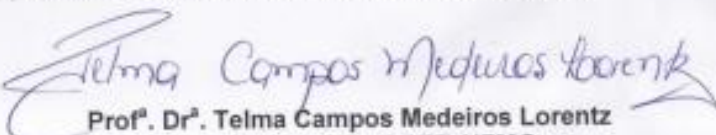
Projeto: CAAE – 32343114.9.0000.5149

Interessado(a): Prof<sup>a</sup>. Denise Utsch Gonçalves  
Depto. de Oftalmologia e Otorrinolaringologia  
Faculdade de Medicina- UFMG

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de setembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação longitudinal clínica e imunológica de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa da região metropolitana de Belo Horizonte" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Campos Medeiros Lorentz  
Coordenadora do COEP-UFMG

Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar – Sala 2005 – Cep:31270-901 – BH-MG  
Telefone: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@ccpq.ufmg.br

## 11 APENDICES

### 11.1 PATENTES DEPOSITADAS DURANTE O DOUTORADO



#### Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 026546 9

#### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 2

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 17217985000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31270-901

**País:** Brasil

**Telefone:** (31) 3409-6430

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/12/2021 às 17:58, Petição 870210120992

**Depositante 2 de 2**

**Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE CRICIÚMA - FUCRI

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 83661074000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Avenida Universitária, n. 1.105, Bairro Universitário

**Cidade:** Criciúma

**Estado:** SC

**CEP:** 88806-000

**Pais:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** KIT PARA DIAGNÓSTICO OU PROGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, MÉTODO E USOS  
**Resumo:** A presente tecnologia trata de um kit contendo peptídeos sintéticos originados de proteínas de Leishmania e método para diagnóstico sorológico ou prognóstico da leishmaniose tegumentar. A tecnologia também trata do uso dos peptídeos e do kit para a detecção de Leishmania em amostras biológicas e para prognóstico da leishmaniose em pacientes.

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/12/2021 às 17:58, Petição 870210120992

16/08/2022 870220073426  
13:53

29409161948457457

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2022 016261 1

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 2

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 17217985000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala  
2011

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31270-901

**País:** Brasil

**Telefone:** (31) 3409-6430

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/08/2022 às  
13:53, Petição 870220073426

**Depositante 2 de 2****Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE CRICIÚMA - FUCRI**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 83661074000104**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Avenida Universitária, 1105, Bairro Universitário**Cidade:** Criciúma**Estado:** SC**CEP:** 88806-000**País:** BRASIL**Telefone:** (48) 343 12606**Fax:****Email:** aditt@unesc.net**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, KIT E MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM COINFECÇÃO COM VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E USO COMO MARCADOR PROGNÓSTICO APÓS TRATAMENTO**Resumo:** A presente tecnologia trata de uma proteína quimérica recombinante obtida através do mapeamento de epítopos específicos de células B das proteínas consideradas hipotéticas e específicas de Leishmania LiHyT, LiHyD, LiHyV e LiHyP. A tecnologia trata também de um kit e método de diagnóstico da leishmaniose em coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) devido à alta sensibilidade da quimera contra anticorpos anti-Leishmania em amostras de pacientes com o vírus. Além do mais, a quimera pode ser utilizada como marcador prognóstico de leishmaniose em pacientes após o tratamento.

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/08/2022 às 13:53, Petição 870220073426

## 11.2 DEMAIS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Immunology Letters 220 (2020) 11–20



Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/immlet](http://www.elsevier.com/locate/immlet)

## Evaluation of *Leishmania infantum* pyridoxal kinase protein for the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis



João A. Oliveira-da-Silva<sup>a</sup>, Amanda S. Machado<sup>a,b</sup>, Fernanda F. Ramos<sup>a</sup>, Grasielle S.V. Tavares<sup>a</sup>, Daniela P. Lage<sup>a</sup>, Fernanda Ludolf<sup>b</sup>, Bethina T. Steiner<sup>c</sup>, Thiago A.R. Reis<sup>a</sup>, Thaís T.O. Santos<sup>a</sup>, Lourena E. Costa<sup>a</sup>, Vivian T. Martins<sup>a</sup>, Nathália C. Galvani<sup>a</sup>, Ana T. Chaves<sup>a</sup>, Jamil S. Oliveira<sup>d</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>e</sup>, Danielle F. de Magalhães-Soares<sup>f</sup>, Mariana C. Duarte<sup>a</sup>, Daniel Menezes-Souza<sup>a</sup>, Julia A.G. Silveira<sup>g</sup>, Ricardo L.F. Moreira<sup>h</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>c</sup>, Unai Tupinambás<sup>a</sup>, Denise U. Gonçalves<sup>a</sup>, Eduardo A.F. Coelho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte. Rua Domingos Vieira, 590, Santa Efigênia, 30150-240, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Peru

<sup>f</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>g</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>h</sup> Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, 30622-020, Minas Gerais, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Pyridoxal kinase  
Recombinant proteins  
Synthetic peptides  
*Leishmania infantum*  
Diagnosis  
Visceral leishmaniasis

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a highly neglected disease that is present in several countries worldwide. Present-day treatments against this disease are unsuitable, mainly due to the toxicity and/or high cost of drugs. In addition, the development of vaccines is still insufficient. In this scenario, a prompt VL diagnosis was deemed necessary, although sensitivity and/or specificity values of the tests have been. In this context, new antigenic candidates should be identified to be employed in a more precise diagnosis of canine and human VL. In this light, the present study evaluated the diagnostic efficacy of the *Leishmania infantum* pyridoxal kinase (PK) protein, applied in its recombinant version (rPK). In addition, one specific B-cell epitope derived of the PK sequence was predicted, synthesized, and evaluated as diagnostic marker. Results in ELISA tests showed that the antigens were highly sensitive to VL identification in dogs and human sera, presenting a low reactivity with VL-related disease samples. The recombinant A2 (rA2) protein and *L. infantum* antigenic preparation (SLA), used as controls, also proved to be highly sensitive in detecting symptomatic cases, although a low sensitivity was found when asymptomatic sera were analyzed. High cross-reactivity was also found when these antigens were evaluated against VL-related disease samples. The post-therapeutic serological follow-up showed that anti-rPK and anti-peptide IgG antibody levels decreased in significant levels after treatment. By contrast, the presence of high levels of the anti-rA2 and anti-SLA antibodies was still detected after therapy. In conclusion, rPK and its specific B-cell epitope should be considered for future studies as a diagnostic marker for canine and human VL.

## 1. Introduction

Leishmaniasis is a disease complex caused by protozoan parasites of the *Leishmania* genus, which occurs in 98 countries worldwide, with nearly 380 million people exposed to the risk of infection [1]. The

clinical manifestations of disease depend mainly on the infecting parasite species, genetic background, and immunologic status of mammalian hosts. Humans and dogs are reservoirs for *Leishmania* viscerotropic species, where the disease is an endemic zoonosis [2,3]. Visceral leishmaniasis (VL) is an important public health problem in

\* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: [eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br](mailto:eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br) (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.01.005>

Received 27 September 2019; Received in revised form 6 January 2020; Accepted 21 January 2020

Available online 22 January 2020

0165-2478/ © 2020 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.





Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)

## Biotechnological applications from a *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral leishmaniasis



João A. Oliveira-da-Silva<sup>a</sup>, Amanda S. Machado<sup>a,b</sup>, Grasiela S.V. Tavares<sup>a</sup>, Fernanda F. Ramos<sup>a</sup>, Daniela P. Lage<sup>a</sup>, Fernanda Ludolf<sup>a</sup>, Bethina T. Steiner<sup>c</sup>, Thiago A.R. Reis<sup>a</sup>, Thaís T.O. Santos<sup>a</sup>, Lourena E. Costa<sup>a</sup>, Raquel S. Bandeira<sup>a</sup>, Vívian T. Martins<sup>a</sup>, Nathália C. Galvani<sup>a</sup>, Ana T. Chaves<sup>a</sup>, Jamil S. Oliveira<sup>d</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>a</sup>, Unaf Tupinambás<sup>a</sup>, Danielle F. de Magalhães-Soares<sup>c</sup>, Julia A.G. Silveira<sup>e</sup>, Sandra Lyon<sup>g</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>c</sup>, Eduardo A.F. Coelho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação Em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

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

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação Em Ciências da Saúde, Universidade Do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>g</sup> Fundação Hospitalar Do Estado de Minas Gerais, Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, 30622-020, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Visceral leishmaniasis  
Hypothetical proteins  
Synthetic peptides  
Diagnosis  
Prognosis  
Immunogenicity

### ABSTRACT

The treatment against visceral leishmaniasis (VL) presents problems, mainly related to the toxicity and/or high cost of the drugs. In this context, a rapid and precise diagnosis of the disease should be performed, mainly to treat patients as soon as possible, aiming to reduce the treatment time and the toxicity of the therapeutics. In the present study, the diagnostic role of an amastigote-specific *Leishmania* protein was evaluated in the canine and human VL. Results showed that the recombinant protein (called rLiHyJ) and one specific B cell epitope (called PeptJ) predicted from protein sequence presented high sensitivity and specificity values to diagnose canine and human disease, showing also a low reactivity against cross-reactive samples. The rA2 protein and a parasite antigenic extract showed variable sensitivity and/or specificity values in the ELISA experiments. A prognostic evaluation of protein and peptide in the human VL indicated that specific IgG antibodies significantly decreased after treatment, when compared to be values obtained before therapy. The *in vitro* immunogenicity using rLiHyJ in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures collected of such patients and healthy subjects suggested that the protein induced lymphoproliferation and high IFN- $\gamma$  production in the stimulated cells. In conclusion, although preliminary, results suggest that rLiHyJ and PeptJ could present distinct biotechnological applications in the canine and human VL.

### 1. Introduction

Leishmaniasis are diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. This disease complex is found in 98 countries in the world, with 380 million people at risk of contracting the infection [1]. The main clinical manifestations of this disease complex comprise tegumentary leishmaniasis (TL), which can evoke since self-limiting lesions until ulcerous scars in the patients, and visceral leishmaniasis

(VL), which is fatal if acute and left non-treated [2,3]. In the Americas, VL is caused by *Leishmania infantum* species, and dogs are considered important domestic reservoirs of the parasites [4].

The limitations found in the treatment of VL are associated with the toxicity and/or high cost of the drugs. In addition, there is no a human vaccine to protect against disease [5]. Also, in the canine disease, the most of infected animals usually develop the asymptomatic infection, did not being promptly diagnosed by the clinical exams and laboratorial

\* Corresponding author. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.  
E-mail address: [eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br](mailto:eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br) (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104283>

Received 7 November 2019; Received in revised form 24 February 2020; Accepted 17 May 2020

Available online 30 May 2020

0882-4010/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cytokine](http://www.elsevier.com/locate/cytokine)

## *Leishmania infantum* amastin protein incorporated in distinct adjuvant systems induces protection against visceral leishmaniasis



Patrícia A.F. Ribeiro<sup>a</sup>, Danniele L. Vale<sup>a</sup>, Daniel S. Dias<sup>a</sup>, Daniela P. Lage<sup>a</sup>, Débora V.C. Mendonça<sup>a</sup>, Fernanda F. Ramos<sup>a</sup>, Lívia M. Carvalho<sup>b</sup>, Ana Maria R.S. Carvalho<sup>a</sup>, Bethina T. Steiner<sup>c</sup>, Marjorie C. Roque<sup>d</sup>, João A. Oliveira-da-Silva<sup>a</sup>, Jamil S. Oliveira<sup>c</sup>, Grasielle S.V. Tavares<sup>a</sup>, Nathália C. Galvani<sup>a</sup>, Vívian T. Martins<sup>a</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>a</sup>, Bruno M. Roatt<sup>b</sup>, Ricardo L.F. Moreira<sup>f</sup>, Daniel Menezes-Souza<sup>a,g</sup>, Mônica C. Oliveira<sup>d</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>c</sup>, Antônio L. Teixeira<sup>a,h</sup>, Eduardo A.F. Coelho<sup>a,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma 88806-000, Santa Catarina, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>f</sup> Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte 30622-020, Minas Gerais, Brazil

<sup>g</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>h</sup> Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX, USA

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Visceral leishmaniasis  
Amastin  
Vaccine  
Immunogenicity  
Adjuvants

### ABSTRACT

The control measures against visceral leishmaniasis (VL) include a precise diagnosis of disease, the treatment of human cases, and reservoir and vector controls. However, these are insufficient to avoid the spread of the disease in specific countries worldwide. As a consequence, prophylactic vaccination could be interesting, although no effective candidate against human disease is available. In the present study, the *Leishmania infantum* amastin protein was evaluated regarding its immunogenicity and protective efficacy against experimental VL. BALB/c mice immunized with subcutaneous injections of the recombinant protein with or without liposome/saponin (Lip/Sap) as an adjuvant. After immunization, half of the animals per group were euthanized and immunological evaluations were performed, while the others were challenged with *L. infantum* promastigotes. Forty-five days after infection, the animals were euthanized and parasitological and immunological evaluations were performed. Results showed the development of a Th1-type immune response in rAmastin-Lip and rAmastin-Sap/vaccinated mice, before and after infection, which was based on the production of protein and parasite-specific IFN- $\gamma$ , IL-12, GM-CSF, and nitrite, as well as the IgG2a isotype antibody. CD4<sup>+</sup> T cells were mainly responsible for IFN- $\gamma$  production in vaccinated mice, which also presented significant reductions in parasitism in their liver, spleen, draining lymph nodes, and bone marrow. In addition, PBMC cultures of treated VL patients and healthy subjects stimulated with rAmastin showed lymphoproliferation and higher IFN- $\gamma$  production. In conclusion, the present study shows the first case of an *L. infantum* amastin protein associated with distinct delivery systems inducing protection against *L. infantum* infection and demonstrates an immunogenic effect of this protein in human cells.

\* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30.130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.  
E-mail address: [eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br](mailto:eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br) (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155031>

Received 11 October 2019; Received in revised form 21 January 2020; Accepted 6 February 2020

Available online 12 February 2020

1043-4666/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)



Research paper

## Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic *Leishmania infantum* proteins



Danniele L. Vale<sup>a</sup>, Daniela P. Lage<sup>a</sup>, Amanda S. Machado<sup>a</sup>, Camila S. Freitas<sup>a</sup>, Daysiane de Oliveira<sup>b</sup>, Nathália C. Galvani<sup>a</sup>, Bruna B. Fernandes<sup>b</sup>, Gabriel P. Luiz<sup>b</sup>, Jamil S. Oliveira<sup>c</sup>, João A. Oliveira-da-Silva<sup>a</sup>, Fernanda F. Ramos<sup>a</sup>, Thaís T.O. Santos<sup>a</sup>, Williane F. Siqueira<sup>d</sup>, Livia A. Alves<sup>e</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>f</sup>, Danielle F. de Magalhães-Soares<sup>g</sup>, Julia A.G. Silveira<sup>d</sup>, Lílian L. Bueno<sup>a,d</sup>, Ricardo T. Fujiwara<sup>a,d</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>b</sup>, Vivian T. Martins<sup>a</sup>, Eduardo A. F. Coelho<sup>a,h,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Igarapé, Igarapé, Minas Gerais, Brazil

<sup>f</sup> Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Peru

<sup>g</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

<sup>h</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Visceral leishmaniasis  
Dogs  
Recombinant chimera  
Commercial kit  
Serodiagnosis  
ELISA

### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an important public health problem in the world, and control measures are insufficient to avoid the spread of this neglected disease. Dogs are important domestic reservoirs of *Leishmania* parasites in countries where VL is a zoonosis, representing a major source of infection between sand fly vectors and humans. In this context, a precise diagnosis of canine leishmaniasis (CanL) could help to reduce the number of human cases. Distinct approaches for the diagnosis of CanL have used recombinant proteins in serological assays. However, variable results of the antigens have been found, mainly to diagnosis asymptomatic cases. The present study used bioinformatics to select specific B-cell epitopes of four *Leishmania infantum* proteins, which had previously been proven to be antigenic in VL, aiming to produce a novel chimeric protein and to evaluate it for the diagnosis of CanL. Seven B-cell epitopes were identified and used to construct the chimera, which was analyzed in a recombinant format through an ELISA assay against a canine serological panel. A soluble *Leishmania* antigenic extract (SLA) was used as an antigen control. Results showed 100 % sensitivity and specificity for chimera, while when using SLA the values were 26.0 % and 96.4 %, respectively. The performance of chimera was compared with a commercial kit using asymptomatic and symptomatic dog sera, and the data showed that no false-negative result was found when the recombinant protein was used. However, when using the commercial kit, 40.0 % and 16.0 % of the false-negative results were found, respectively. In conclusion, the recombinant chimera showed an antigenic potential to be evaluated in new studies against a larger serological panel for the diagnosis of CanL.

\* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: [eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br](mailto:eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br) (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109513>

Received 24 April 2021; Received in revised form 25 June 2021; Accepted 26 June 2021

Available online 1 July 2021

0304-4017/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.



# Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins

Rahisa Scussel, Paulo Emilio Feuser, Gabriel Paulino Luiz, Nathalia Coral Galvani, Mirian Ívens Fagundes, Alexandre Gonçalves Dal-Bó, Pedro Henrique Hermes de Araújo, Eduardo Antônio Ferraz Coelho, Carlos Chávez-Olortegui, and Ricardo Andrez Machado-de-Ávila\*

Cite This: *ACS Appl. Nano Mater.* 2022, 5, 642–653

Read Online

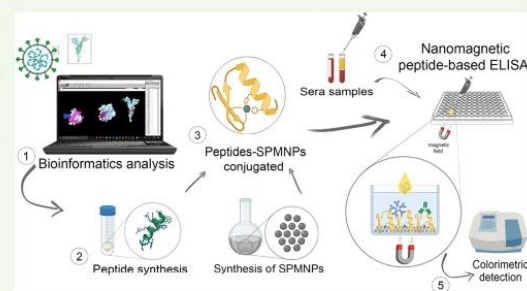
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

**ABSTRACT:** The COVID-19 pandemic, caused by the fast transmission and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is currently considered a serious health problem, requiring an effective strategy to contain SARS-CoV-2 dissemination. For this purpose, epitopes of the SARS-CoV-2 spike (S) and nucleocapsid (N) proteins were identified by bioinformatics tools, and peptides that mimic these epitopes were chemically synthesized and then conjugated to superparamagnetic nanoparticles (SPMNP). Three peptides from S protein and three from N protein were used as antigens in a conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against serum samples from COVID-19-positive patients, or from healthy donors, collected before the pandemic. Three peptides were effective as antigens in conventional peptide-based ELISA, achieving 100% sensitivity and specificity, with high accuracy. The best-performing peptides, p2pS, p1pN, and p3pN, were associated with superparamagnetic nanoparticles (SPMNPs) and were used to perform nanomagnetic peptide-based ELISA. The p2pS–SPMNP conjugate presented 100% sensitivity and specificity and excellent accuracy (area under the curve (AUC) = 1.0). However, p1pN and p3pN peptides, when conjugated to SPMNPs, did not preserve the capacity to differentiate positive sera from negative sera in all tested samples, yet both presented sensitivity and specificity above 80% and high accuracy, AUC > 0.9. We obtained three peptides as advantageous antigens for serodiagnosis. These peptides, especially p2pS, showed promising results in a nanomagnetic peptide-based ELISA and may be suitable as a precoated antigen for commercial purposes, which would accelerate the diagnosis process.

**KEYWORDS:** superparamagnetic nanoparticles, peptide, COVID-19, serodiagnosis, antigens, SARS-CoV-2



## 1. INTRODUCTION

The pandemic caused by the 2019 coronavirus disease (COVID-19), an infectious disease, is now considered a major challenge for global health due to high mortality and morbidity rates.<sup>1</sup> In this sense, the better understanding of the disease current situation and the development of strategies to contain the virus spreading is urgently required.<sup>2</sup> Despite the significant investment in research, there are no specific clinical treatments registered for COVID-19 so far. Furthermore, even considering the best scenario, with vaccines against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), part of the population may still be infected and develop symptomatology.<sup>3–5</sup>

Therefore, diagnosis tests are a good front-line strategy to recognize infected people and limit the spread of coronavirus. Serological tests allow the evaluation of the population exposed

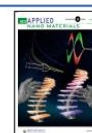
to the virus, as well as the determination of heterogeneity and the duration of humoral immune response. The early detection of the infection is decisive as it supports the search for more appropriate therapies.<sup>6</sup>

The diagnostic methods to detect SARS-CoV and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), a virus that presents a high structural similarity with SARS-CoV-2, are based on spike (S) and nucleocapsid (N) structural proteins.<sup>7,8</sup> The S protein is a SARS-CoV-2 glycoprotein that protrudes

Received: October 15, 2021







Accepted: January 5, 2022

Published: January 14, 2022



## Article

# A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes from Amastigote Proteins and Combined with Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection against *Leishmania infantum* Infection

Daniela P. Lage<sup>1</sup>, Danniele L. Vale<sup>1</sup>, Flávia P. Linhares<sup>1</sup>, Camila S. Freitas<sup>1</sup> , Amanda S. Machado<sup>1</sup>, Jamille M. O. Cardoso<sup>2</sup>, Daysiane de Oliveira<sup>3</sup>, Nathália C. Galvani<sup>1</sup>, Marcelo P. de Oliveira<sup>1</sup>, João A. Oliveira-da-Silva<sup>1</sup>, Fernanda F. Ramos<sup>1</sup> , Grasielle S. V. Tavares<sup>1</sup>, Fernanda Ludolf<sup>1</sup>, Raquel S. Bandeira<sup>1</sup>, Isabela A. G. Pereira<sup>1</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>4</sup> , Bruno M. Roatt<sup>2</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>3</sup> , Myron Christodoulides<sup>5,\*</sup> , Eduardo A. F. Coelho<sup>1,6,†</sup>  and Vivian T. Martins<sup>1,†</sup>



Citation: Lage, D.P.; Vale, D.L.; Linhares, F.P.; Freitas, C.S.; Machado, A.S.; Cardoso, J.M.O.; de Oliveira, D.; Galvani, N.C.; de Oliveira, M.P.; Oliveira-da-Silva, J.A.; et al. A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes from Amastigote Proteins and Combined with Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection against *Leishmania infantum* Infection. *Vaccines* **2022**, *10*, 1146. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071146>

Academic Editors: Jonathan Lalsiamthara and Junko Maruyama

Received: 22 June 2022  
Accepted: 16 July 2022  
Published: 19 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> 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, Belo Horizonte 30130-100, MG, Brazil; danipagliara@hotmail.com (D.P.L.); dani.dlv@hotmail.com (D.L.V.); flaviaprata13@hotmail.com (F.P.L.); camilasimoesf@gmail.com (C.S.F.); manda\_sanchez92@hotmail.com (A.S.M.); nathaliagalvani05@gmail.com (N.C.G.); marcelloperdigao@outlook.com (M.P.d.O.); joaoasilva@gmail.com (J.A.O.-d.-S.); fe.fonseccamos@gmail.com (F.F.R.); grasysv@hotmail.com (G.S.V.T.); feludolf@gmail.com (F.L.); raquelsoares.id@gmail.com (R.S.B.); amorim.gpereira@gmail.com (I.A.G.P.); eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F.C.); viviantamietti@yahoo.com.br (V.T.M.)
  - <sup>2</sup> Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto CEP 35400-000, MG, Brazil; jam.mirelle@gmail.com (J.M.O.C.); bmroatt@gmail.com (B.M.R.)
  - <sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma 88806-000, SC, Brazil; daysiolv@yahoo.com.br (D.d.O.); r\_andrez@yahoo.com.br (R.A.M.-d.-Á.)
  - <sup>4</sup> Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa 04000, Peru; mchavezf@ucsm.edu.pe
  - <sup>5</sup> Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, Faculty of Medicine, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton, Southampton General Hospital, Southampton SO16 6YD, UK
  - <sup>6</sup> Departamento de Patologia Clínica, Colégio Técnico (COLTEC), Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil
- \* Correspondence: mc4@soton.ac.uk; Tel.: +44-02381-205120  
† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Currently, there is no licensed vaccine to protect against human visceral leishmaniasis (VL), a potentially fatal disease caused by infection with *Leishmania* parasites. In the current study, a recombinant chimeric protein ChimT was developed based on T-cell epitopes identified from the immunogenic *Leishmania* amastigote proteins LiHyp1, LiHyV, LiHyC and LiHyG. ChimT was associated with the adjuvants saponin (Sap) or monophosphoryl lipid A (MPLA) and used to immunize mice, and their immunogenicity and protective efficacy were evaluated. Both ChimT/Sap and ChimT/MPLA induced the development of a specific Th1-type immune response, with significantly high levels of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  and GM-CSF cytokines produced by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subtypes ( $p < 0.05$ ), with correspondingly low production of anti-leishmanial IL-4 and IL-10 cytokines. Significantly increased ( $p < 0.05$ ) levels of nitrite, a proxy for nitric oxide, and IFN- $\gamma$  expression ( $p < 0.05$ ) were detected in stimulated spleen cell cultures from immunized and infected mice, as was significant production of parasite-specific IgG2a isotype antibodies. Significant reductions in the parasite load in the internal organs of the immunized and infected mice ( $p < 0.05$ ) were quantified with a limiting dilution technique and quantitative PCR and correlated with the immunological findings. ChimT/MPLA showed marginally superior immunogenicity than ChimT/Sap, and although this was not statistically significant ( $p > 0.05$ ), ChimT/MPLA was preferred since ChimT/Sap induced



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)



## Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis

Danniele L. Vale<sup>a</sup>, Amanda S. Machado<sup>a</sup>, Fernanda F. Ramos<sup>a</sup>, Daniela P. Lage<sup>a</sup>, Camila S. Freitas<sup>a</sup>, Daysiane de Oliveira<sup>b</sup>, Nathalia C. Galvani<sup>a</sup>, Gabriel P. Luiz<sup>b</sup>, Mirian I. Fagundes<sup>b</sup>, Bruna B. Fernandes<sup>b</sup>, João A. Oliveira-da-Silva<sup>a</sup>, Fernanda Ludolf<sup>a</sup>, Grasielle S.V. Tavares<sup>a</sup>, Nathalia S. Guimarães<sup>a</sup>, Ana T. Chaves<sup>a</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>c</sup>, Unaf Tupinambás<sup>a</sup>, Manoel O.C. Rocha<sup>a</sup>, Denise U. Gonçalves<sup>a</sup>, Vívian T. Martins<sup>a</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>b</sup>, Eduardo A.F. Coelho<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup> Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, 04000, Peru

<sup>d</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Leishmaniasis  
Diagnosis  
Chimeric protein  
B-Cell epitopes  
Sensitivity  
Specificity

### ABSTRACT

The diagnosis of leishmaniasis presents problems due to the variable sensitivity and/or specificity of tests. In addition, high levels of anti-parasite antibodies can remain after treatment, making it difficult to conduct a prognostic follow-up of patients. In this context, it is necessary to identify new candidates to be examined for the sensitive and specific diagnosis of the disease. In the present study, four *Leishmania* proteins, previously shown as antigenic for tegumentary leishmaniasis (TL), were evaluated, and their linear specific B-cell epitopes were predicted and used to generate a new gene codifying chimeric protein called ChimB, which was cloned, and the recombinant version was expressed, purified, and evaluated in ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) to diagnose TL and visceral leishmaniasis (VL). A total of 220 human serum samples were used, and, when ChimB was used, results showed sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of 100% for the diagnosis of both diseases; however, when using peptides, the sensitivity values reached from 28.0% to 57.3% and specificity varied from 16.3% to 83.7%. A soluble *Leishmania* extract (SLA) showed sensitivity and specificity values of 30.7% and 45.9%, respectively. The area under the curve (AUC) value for ChimB was 1.0, while for synthetic peptides, this value reached between 0.502 and 0.635, whereas for SLA, the value was of 0.589. Serological assays using sera samples collected before and after treatment showed significant reductions in the anti-ChimB antibody levels after therapy, suggesting a prognostic role of this recombinant antigen. In conclusion, preliminary data suggest the use from ChimB as a potential candidate for the diagnosis and prognosis of leishmaniasis.

### 1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected disease complex caused by different species of the protozoan parasites of genus *Leishmania*, which are transmitted by bites of infected sandflies [1]. There are about 20 parasite species able to cause disease in humans and an incidence of 0.2–0.4

million cases of visceral leishmaniasis (VL) and 0.7 to 1.2 million cases of tegumentary leishmaniasis (TL) is estimated to occur annually. Over 90% of VL cases have been registered in Bangladesh, Ethiopia, Brazil, India, Sudan, and South Sudan. TL is more widespread and occurs in countries, such as Afghanistan, Algeria, Brazil, Iran, Peru, Ethiopia, North Sudan, Costa Rica, Colombia, and Syria [2]. VL is the most severe

\* Corresponding author. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: [eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br](mailto:eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br) (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105562>

Received 14 January 2022; Received in revised form 26 April 2022; Accepted 27 April 2022

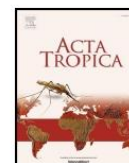
Available online 2 May 2022

0882-4010/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)

## Immunoproteomics approach for the discovery of antigens applied to the diagnosis of canine visceral leishmaniasis

Scarleth Silva Costa<sup>a</sup>, Lucas Magno Oliveira Santos<sup>b</sup>, Larissa Chaves Freire<sup>a</sup>, Ana Luiza Filizzola Tedeschi<sup>b</sup>, Naianda Rezende Ribeiro<sup>a</sup>, Mariana Helena Rodrigues Queiroz<sup>b</sup>, Emídio Beraldo Neto<sup>c</sup>, Daniel Carvalho Pimenta<sup>c</sup>, Nathalia Coral Galvani<sup>g</sup>, Gabriel Paulino Luiz<sup>g</sup>, Maria Eduarda de Oliveira<sup>h</sup>, Ricardo Andrez Machado de Ávila<sup>g,h</sup>, Ana Maria Ravena Severino Carvalho<sup>a</sup>, Bryan Victor Serafim Brigido<sup>b</sup>, Alexandre Barbosa Reis<sup>d,e</sup>, Ana Paula Salles Moura Fernandes<sup>f</sup>, Eduardo Antonio Ferraz Coelho<sup>a,b</sup>, Bruno Mendes Roatt<sup>d,e</sup>, Daniel Menezes-Souza<sup>a,b</sup>, Mariana Costa Duarte<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Morfopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Pesquisas Clínicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacéuticas/CiPharma, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

<sup>f</sup> Centro de Tecnologia de Vacinas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>g</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil

<sup>h</sup> Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Leishmaniasis  
Proteomic  
Immunoproteomic  
Serological diagnosis

### ABSTRACT

In the present study, an immunoproteomic approach using *Leishmania infantum* parasites isolated from naturally infected dogs from an endemic region of the disease, was carried out to identify new antigens to be used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL). Protein extracts, obtained from parasites isolated from asymptomatic (CanLA) and symptomatic (CanLS) dogs, were used to perform the two-dimensional gels. Western Blotting assays were carried out by employing a pool of sera from dogs with visceral leishmaniasis (CanLA or CanLS), healthy dogs from an endemic area, or dogs with similar diseases associated with cross-reactions (babesiosis and ehrlichiosis). With these results, it was possible to exclude the spots that showed a cross-reactivity of the sera from groups of healthy dogs, and those with babesiosis or ehrlichiosis. Taken together, 20 proteins were identified, 15 of which have already been described in the literature and 5 of which are hypothetical. An immunogenomic screen strategy was applied to identify conserved linear B-cell epitopes in the identified hypothetical proteins. Two peptides were synthesized and tested in ELISA experiments as a proof of concept for the validation of our immunoproteomics findings. The results demonstrated that the antigens presented sensitivity and specificity values ranging from 81.93% to 97.59% and 78.14 to 85.12%, respectively. As a comparative antigen, a preparation of a *Leishmania* extract showed sensitivity and specificity values of 75.90% and 74.88%, respectively. The present study was able to identify proteins capable of being used for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis.

\* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: [marianaduarte@ufmg.br](mailto:marianaduarte@ufmg.br) (M.C. Duarte).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106865>

Received 25 October 2022; Received in revised form 9 February 2023; Accepted 11 February 2023

Available online 12 February 2023

0001-706X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 11.3 DADOS SUPLEMENTARES

## 11.3.1 Alinhamento e avaliação de similaridade entre as sequencias das proteínas

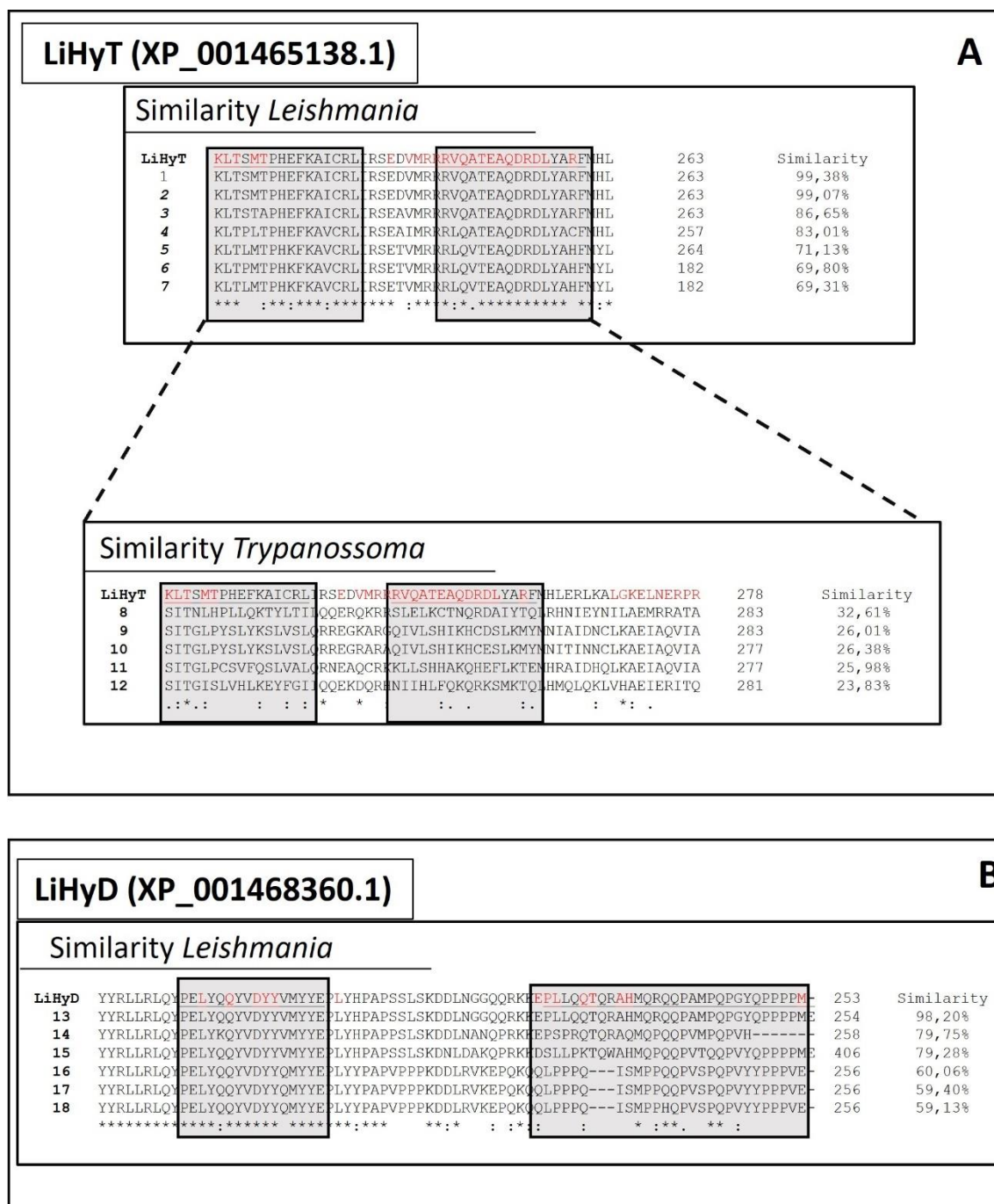
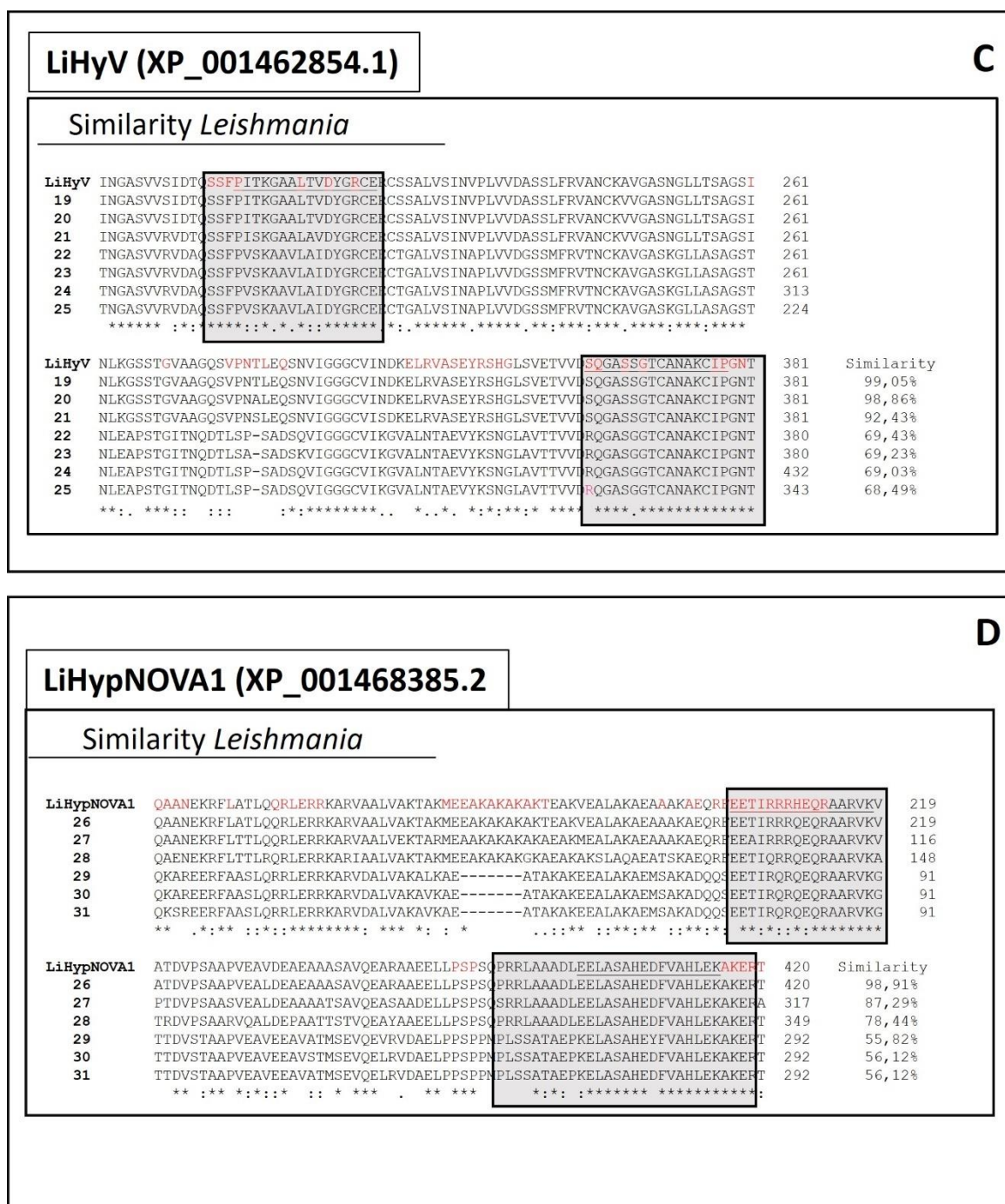


Figura 8 – Alinhamento e avaliação de similaridade entre as sequencias das proteínas. (A) LiHyT (XP\_001465138.1) e (B) LiHyD (XP\_001468360.1). Em (A) os números se referem a 1 - *L. donovani* (XP\_003860346.1), 2 - *L. donovani* (AYU78285.1), 3 - *L. major* strain Friedlin (XP\_001682758.1), 4 - *L. mexicana* (XP\_003875068.1), 5 - *L. guyanensis* (CCM15154.1), 6 - *L. braziliensis* (XP\_001564693.1), 7 - *L. panamensis* (XP\_010698627.1), enquanto 8 - *T. grayi* (XP\_009312053.1), 9 - *T. cruzi* CLBrener (XP\_816071.1), 10 - *T. cruzi* CLBrener (XP\_811098.1), 11 - *T. conorhini* (XP\_029225770.1) e 12 - *T. theileri* (XP\_028883154.1). Em (B) 13 - *L. donovani* (XP\_003864139.1), 14 - *L. mexicana* (XP\_003878557.1), 15 - *L. major* (XP\_001686061.1),



16 - *L. braziliensis* (XP\_001568093.1), 17 - *L. guyanensis* (CCM18756.1), 18 - *L. panamensis* (XP\_010702401.1). Aminoácidos destacados em vermelho, representam ser acessíveis segundo dados fornecidos pelo IEDB, enquanto regiões sublinhadas representam ser epítomos com alta probabilidade de resposta B segundo dados fornecidos pelo ABCpred. As sequencias foram alinhadas pelo programa Clustal Ômega.



D

**LiHypNOVA1 (XP\_001468385.2)**

**Similarity *Leishmania***

<b>LiHypNOVA1</b>	QAANEKRFATLQQRLEERRKARVAALVAKTAKMEEAKAKAKAKTEAKVEALAKAEAAAKAEQRHEETIRRHEQRAARVKV	219	
<b>26</b>	QAANEKRFATLQQRLEERRKARVAALVAKTAKMEEAKAKAKAKTEAKVEALAKAEAAAKAEQRHEETIRRHEQRAARVKV	219	
<b>27</b>	QAANEKRFATLQQRLEERRKARVAALVEKTARMEAAKAKAKAKAEAKMEALAKAEAAAKAEQRHEETIRRHEQRAARVKV	116	
<b>28</b>	QAANEKRFATLQQRLEERRKARVAALVAKTAKMEEAKAKAKAKGKAEAKAKSLAQAEATSKAEQRHEETIRRHEQRAARVKA	148	
<b>29</b>	QKAREERFAASLQQRLEERRKARVDALVAKALKAE-----ATAKAKEEALAKAEMSAKADQQS EETIRQRQEQRRAARVKG	91	
<b>30</b>	QKAREERFAASLQQRLEERRKARVDALVAKAVKAE-----ATAKAKEEALAKAEMSAKADQQS EETIRQRQEQRRAARVKG	91	
<b>31</b>	QKSREERFAASLQQRLEERRKARVDALVAKAVKAE-----ATAKAKEEALAKAEMSAKADQQS EETIRQRQEQRRAARVKG	91	
	** .*:** :*:*****: *** *.: * ..:*** :***:*** :***:***:*****		

<b>LiHypNOVA1</b>	ATDVPSAAPVEAVDEAEAAASAVQEARAEEELLPSPSQPRRLAADLEELASAHEDFVAHLEKAKEPT	420	Similarity
<b>26</b>	ATDVPSAAPVEAVDEAEAAASAVQEARAEEELLPSPSQPRRLAADLEELASAHEDFVAHLEKAKEPT	420	98,91%
<b>27</b>	PTDVPSAASVEALDEAAASAVQEASADELPSPSQSRRLAADLEELASAHEDFVAHLEKAKEPT	317	87,29%
<b>28</b>	TRDVPSAARVQALDEPAATSTVQEAAYAAEELLPSPSQPRRLAADLEELASAHEDFVAHLEKAKEPT	349	78,44%
<b>29</b>	TTDVSTAAPVEAVEEAVTMSEVQELRVDAELPPSPPLSSATAEPKELASAHEDFVAHLEKAKEPT	292	55,82%
<b>30</b>	TTDVSTAAPVEAVEEAVTMSEVQELRVDAELPPSPPLSSATAEPKELASAHEDFVAHLEKAKEPT	292	56,12%
<b>31</b>	TTDVSTAAPVEAVEEAVTMSEVQELRVDAELPPSPPLSSATAEPKELASAHEDFVAHLEKAKEPT	292	56,12%
	** :*** :*** :*: * ** . ** ** * ** * :***:*****		

Figura 9 – Alinhamento e avaliação de similaridade entre as sequencias das proteínas (C) LiHyV (XP\_001462854.1) e (D) LiHypNOVA1 (XP\_001468385.2).

Em (C) 19 - *L. donovani* (AYU75793.1), 20 - *L. donovani* (XP\_003858079.1), 21 - *L. major* (XP\_888528.1), 22 - *L. braziliensis* (SYZ62586.1), 23 - *L. panamensis* (XP\_010703666.1), 24 - *L. braziliensis* (XP\_001561707.1), 25 - *L. braziliensis* (SYZ62584.1). Em (D) 26 - *L. donovani* (XP\_003864163.1), 27 - *L. major* (XP\_001686087.1), 28 - *L. mexicana* (XP\_003878581.1), 29 - *L. braziliensis* (XP\_001568117.1), 30 - *L. guyanensis* (CCM18782.1) e 31 - *L. panamensis* (XP\_010702426.1). Aminoácidos destacados em vermelho, representam ser acessíveis segundo dados fornecidos pelo IEDB, enquanto regiões sublinhadas representam ser epítomos com alta probabilidade de resposta B segundo dados fornecidos pelo ABCpred. As sequencias foram alinhadas pelo programa Clustal Ômega.

### 11.3.2 Sequência linear da proteína quimera

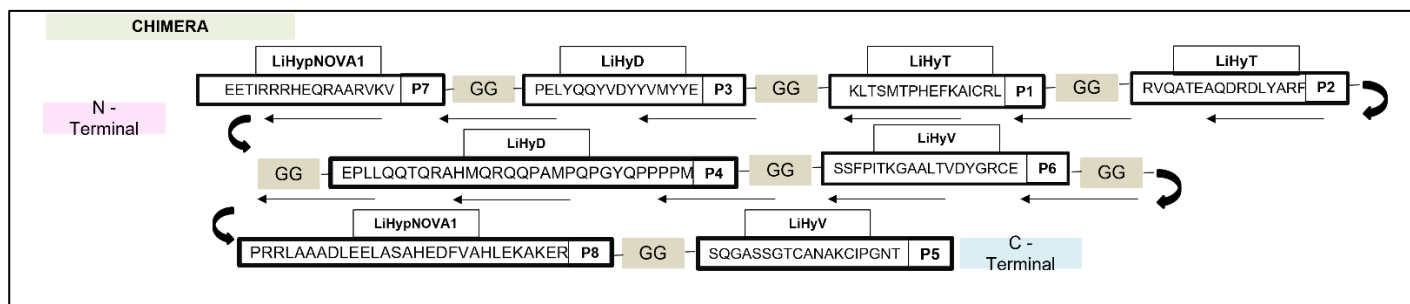


Figura 10 - Sequência linear da proteína quimera. Está representado a sequência de aminoácidos e ordem dos peptídeos de cada proteína, conforme alocados na nova proteína quimera.

### 11.3.3 Confirmação dos epítomos com provável resposta celular do tipo B

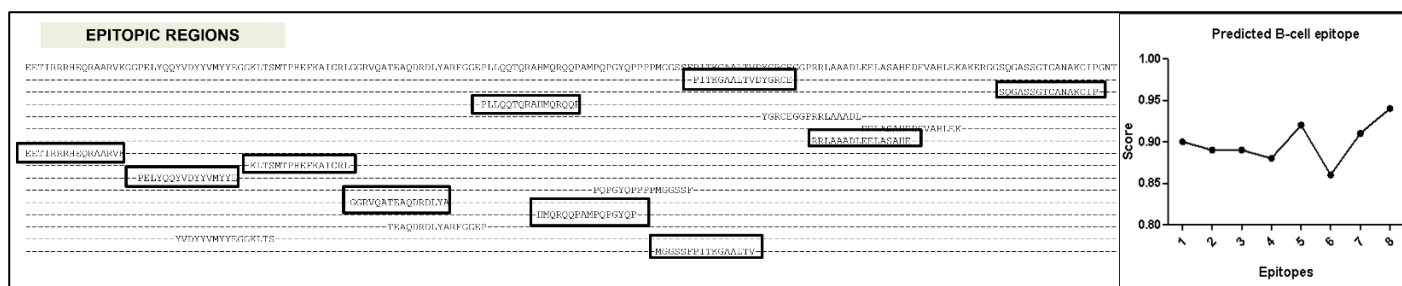


Figura 11 – Confirmação dos epítomos com provável resposta celular do tipo B. Está sendo demonstrado a confirmação pelo ABCpred de que os peptídeos se mantiveram como epítomos de células B, com score a partir de 0.85 mesmo quando alocados em diferentes posições das de origem, na então nova proteína.

### 11.3.4 Características físico e químico da proteína quimera

#### CHIMERA PROTEIN CHARACTERIZATION

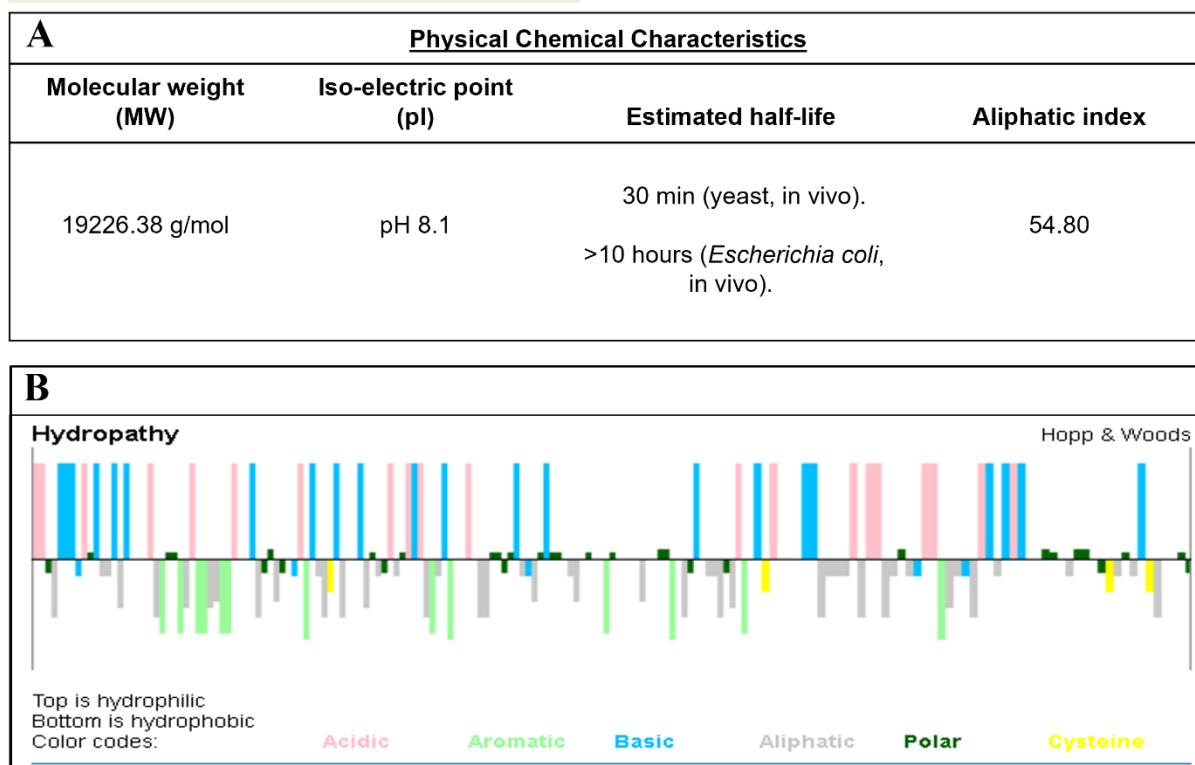


Figura 12 – Características físico e químicas da proteína quimera. Em (A) demonstra os parâmetros físicos e químicos da proteína quimera, incluindo cálculos massa molecular, ponto isoelétrico, meia-vida estimada e índice alifático fornecidos pela ferramenta ProtParam. Em (B) representa a solubilidade da proteína quimérica, fornecida pelo servidor PepCalc.

### 11.3.5 Gel SDS-PAGE da proteína quimérica.

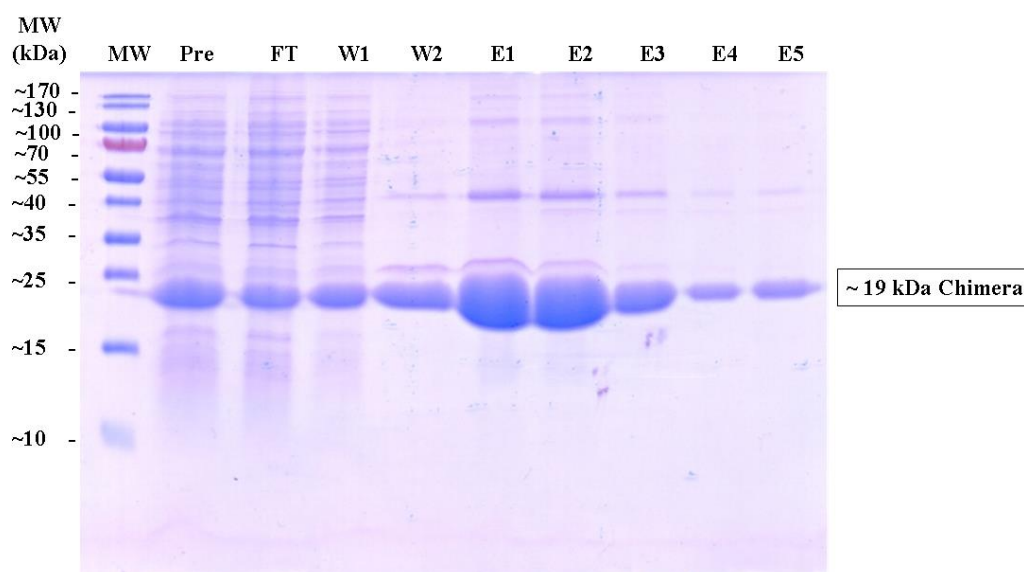


Figura 13 - Gel SDS-PAGE da proteína quimérica. Um gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, com as amostras da proteína quimérica foi obtido dos ensaios de expressão e purificação, sendo submetidas a eletroforese de separação. É possível observar que a proteína quimérica (19,2 kDa) foi purificada, passando por duas lavagens e cinco eluições.

### 11.3.6 Soros humanos utilizados no estudo

Soros humanos	(n) amostral
LV	45
LV/HIV	25
LC	25
LM	30
Indivíduos saudáveis área endêmica	45
Doenças de Chagas	40
Tuberculose	10
Malária	10
Hanseníase	20
Aspergilose	15
HIV	20
Pacientes LV (antes e após 6 meses de tratamento)	6
Pacientes LT (antes e após 6 meses de tratamento)	15

Figura 14 - Soros humanos utilizados no estudo. Representa o (n) amostral que foi utilizado como plataforma de soros para os ensaios de ELISA frente a todos os antígenos desenvolvidos.