

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

Daniela Pagliara Lage

SELEÇÃO DE ANTÍGENOS DE *Leishmania infantum* POR
IMUNOPROTEÔMICA PARA EMPREGO NO DIAGNÓSTICO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Belo Horizonte
2020

Daniela Pagliara Lage

**SELEÇÃO DE ANTÍGENOS DE *Leishmania infantum* POR
IMUNOPROTEÔMICA PARA EMPREGO NO DIAGNÓSTICO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

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 Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadores: Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho
Dra. Vivian Tamietti Martins

Belo Horizonte

2020

L174s Lage, Daniela Pagliara.
Seleção de antígenos de *Leishmania infantum* por imunoproteômica para emprego no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Humana [recursos eletrônicos]. / Daniela Pagliara Lage. - - Belo Horizonte: 2023.
76f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antônio Ferraz Coelho.
Coorientador (a): Vivian Tamietti Martins.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. *Leishmania infantum*. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Diagnóstico. 4. Proteínas Recombinantes. 5. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. II. Martins, Vivian Tamietti. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 715

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Seleção de antígenos de Leishmania infantum por imunoproteômica para emprego no diagnóstico da leishmaniose visceral humana"

DANIELA PAGLIARA LAGE

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 16 de dezembro de 2020, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - Orientador

UFMG

DRA. VIVIAN TAMIETTI MARTINS - Orientadora

UFMG

DR. VINICIO TADEU DA SILVA COELHO

UFMG

DRA. ANA THEREZA CHAVES

UFMG

DRA. LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI

UFJF

PROF. MÁRIO DA SILVA GIUSTA

UNA - BH

Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Vinício Tadeu da Silva Coelho, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 16/12/2020, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria Ribeiro Antinarelli, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 18:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Tamietti Martins, Usuário Externo**, em 17/12/2020, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mário da Silva Giusta, Usuário Externo**, em 17/12/2020, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Thereza Chaves Lages, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 12:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0469059** e o código CRC **425A5790**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Fábio Alves da Silva Júnior

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Mario Fernando Montenegro Campos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Humberto José Alves

VICE-DIRETORA: Profa. Alamanda Kfoury Pereira

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:

Profa. Eli Iola Gurgel Andrade

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

VICE-COORDENADOR: Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Prof. Dr. Unai Tupinambás

Profa. Dr. Mariana Costa Duarte

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Júnior

João Augusto Oliveira da Silva – Representante Discente

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por abençoar minha vida, me ajudar a superar dificuldades e colocar oportunidades e pessoas essenciais em meu caminho.

À minha família, minha base, obrigada pelo amor e apoio incondicional sempre. Agradeço aos meus pais André e Luiza, por acreditarem em mim e nunca medirem esforços para a realização dos meus sonhos. Ao meu irmão Guilherme, pelo companheirismo, apoio e carinho.

Ao Professor Eduardo Antonio Ferraz Coelho, por me receber em seu laboratório de portas abertas e pelos quase 10 anos de convivência. Obrigada pelas oportunidades e confiança que sempre me foram dadas, bem como a paciência e tempo dedicados em me orientar. Agradeço pelo exemplo, aprendizado e por proporcionar meu crescimento como pesquisadora.

À Vívian, pela orientação e, acima de tudo pela amizade, dedicação e parceria, que vão muito além do ambiente de trabalho. Obrigada por me entender, escutar e me ensinar tanto! Agradeço por sua eterna disposição em me ajudar, por sua companhia e por sempre me fazer sorrir.

À minha aluna de Iniciação Científica Patrícia, pelo grande auxílio na realização deste trabalho. Obrigada pela paciência, disponibilidade e vontade de aprender.

Aos amigos do laboratório, pelo ótimo convívio, ajuda e aprendizado. Obrigada pela amizade e por tornarem o trabalho ainda mais prazeroso.

Aos meus amigos da vida, que de alguma forma tiveram participação no decorrer e na finalização deste trabalho. Obrigada por tornarem a vida mais leve, pelos tantos momentos de descontração e pela torcida de sempre.

Aos pesquisadores que colaboraram com este trabalho, Dr. Carlos Alberto P. Tavares, Dra. Fernanda Ludolf, Dra. Mariana Costa Duarte, Dr. Daniel Silva Dias, Dra. Patrícia

Ribeiro e Dr. Miguel Fumagalli, agradeço pelo auxílio, sugestões e contribuições ao longo do desenvolvimento do mesmo.

RESUMO

O controle da leishmaniose visceral (LV) requer um diagnóstico e tratamento adequados, uma vez que o diagnóstico preciso é fundamental para um regime medicamentoso eficaz para os pacientes. Nesse contexto, as ferramentas biotecnológicas devem ser aprimoradas para o manejo clínico e a avaliação epidemiológica da doença. No entanto, existem limitações relacionadas com a sensibilidade e/ou especificidade dos antígenos usados atualmente, mostrando a necessidade de identificação de novas moléculas para serem testadas em um diagnóstico sorológico mais sensível e específico. Neste sentido, no presente estudo, uma abordagem imunoproteômica foi usada para identificar proteínas antigênicas das formas promastigotas e amastigotas da espécie *Leishmania infantum*, causadora de LV em nosso país, por meio de seu reconhecimento por anticorpos em soros de pacientes com a doença. Amostras de indivíduos saudáveis residentes em região endêmica da doença e de pacientes com Doença de Chagas foram utilizadas com a função de se obter proteínas mais específicas ao parasito *Leishmania* para serem avaliadas no diagnóstico da LV. Como resultados obtidos, um total de 29 e 21 proteínas foram identificadas nos extratos de formas promastigotas e amastigotas dos parasitos, respectivamente. Para a validação da capacidade diagnóstica, duas proteínas, endonuclease III e GTP-binding protein, foram selecionadas, clonadas, expressas e purificadas para serem testadas em experimentos de ELISA. Os resultados dos testes mostraram valores de sensibilidade e especificidade superiores a 99,0% para a identificação da LV. Os antígenos ainda exibiram um diferencial ao apresentarem baixa reatividade sorológica em pacientes curados e tratados, sugerindo a possibilidade de que as mesmas possam ser aplicadas como marcadores prognósticos da doença. Em conclusão, o estudo imunoproteômico se mostrou eficaz na seleção de proteínas antigênicas de *L. infantum* e duas delas, endonuclease III e GTP-binding protein, foram bem avaliadas para o diagnóstico da LV frente a um painel sorológico, além de demonstrarem um potencial para monitoramento de pacientes com LV após o tratamento.

Palavras-chave: imunoproteômica; *Leishmania infantum*; leishmaniose visceral; diagnóstico; proteínas recombinantes.

ABSTRACT

The control of visceral leishmaniasis (VL) requires an adequate diagnosis and treatment, since an accurate diagnosis is essential for an effective medication regimen for patients. In this context, biotechnological tools must be improved for the clinical management and epidemiological assessment of the disease. However, there are limitations related to the sensitivity and / or specificity of the antigens currently used, showing the necessity to identify new molecules to be tested in a more sensitive and specific serological diagnosis. In this sense, in the present study, an immunoproteomics approach was used to identify antigenic proteins of the *Leishmania infantum* promastigote and amastigote forms, which causes VL in our country, through its recognition by antibodies in sera of patients with the disease. Samples from healthy individuals living in an endemic region of the disease and from patients with Chagas disease were used to obtain more specific proteins for the *Leishmania* parasite, aiming their future application in the VL diagnosis. As results obtained, a total of 29 and 21 proteins were identified in the extracts of parasitic promastigotes and amastigotes, respectively. For validation of the diagnostic capacity, two proteins, endonuclease III and GTP-binding protein, were selected, cloned, expressed and purified to be tested in ELISA experiments. The test results showed sensitivity and specificity values greater than 99.0% for the identification of VL. The antigens also exhibited a differential when presenting low serological reactivity in cured and treated patients, suggesting the possibility that they can be applied as prognostic markers of the disease. In conclusion, the immunoproteomic study proved to be effective in the selection of *L. infantum* antigenic proteins and two of them, endonuclease III and GTP-binding protein, were well evaluated for the diagnosis of VL against a serological panel, in addition, demonstrating a potential for monitoring patients with VL after treatment.

Keywords: immunoproteomics; *Leishmania infantum*; visceral leishmaniasis; diagnosis; recombinant proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania sp.</i>	19
Figura 2: Eletroforese em gel 2-DE.....	27
Figura 3: Sequência de aminoácidos da proteína Endonuclease III.....	28
Figura 4: Sequência de aminoácidos da proteína GTP binding.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® ou **TM** - Marca registrada

µg – Micrograma

µL- Microlitro

2-DE - Gel bidimensional

Abs - Absorbância

AC- Accuracy

ANOVA - Análise de variância

AUC - Area under the curve

CD - Chagas Disease

CI- Confidence interval

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa

DAT- Teste de aglutinação direta, do inglês *Direct Agglutination Test*

DC - Doença de Chagas

DO - Densidade ótica

DTT - Ditioneitol

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

g - grama

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

IC - Intervalo de confiança

IEF - Focalização isoeletrica

IFAT- Teste de imunofluorescência indireta, do inglês *Indirect Fluorescent Antibody Test*

IFN-γ - Interferon-gama

IgG - Imunoglobulina G

IHA - *Indirect Hemagglutination Test*

IL – Interleucina

IPG- Immobilized pH gradient

KDa - kilodalton

LT - Leishmaniose tegumentar

LV - Leishmaniose visceral

LVH - Leishmaniose visceral humana

MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

mA - miliampère

Meio LB - Meio Luria Bertani

mg - miligrama

mL- mililitro

mM - milimolar

MS- Mass Spectrometry

n - número amostral

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

ng - nanograma

nm - nanômetro

OD – Optical density

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - Orto-fenilenodiamina

ORF - Open reading frame

pb - pares de bases

PBS - Solução salina de tampão fosfato

PBS-T- Solução salina de tampão fosfato com Tween 20

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PI - Ponto isoelétrico

r – recombinante

rENDO - Endonuclease III recombinante

rGTP- GTP binding protein recombinante

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

rK39 -proteína recombinante cinesina de 39 kDa

ROC- Característica de operação do receptor, do inglês Receiver Operating Characteristic

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida desnaturante

SE - Sensitivity

SFB - Soro fetal bovino

SLA - Extrato proteico antigênico solúvel de *Leishmania spp.*

SP - specificity

TBS- Solução salina de tampão Tris

TBS-T- Solução salina de tampão Tris com Tween 20

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VL- Visceral leishmaniasis

VLH – human visceral leishmaniasis

WB - Western-Blotting

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Epidemiologia das leishmanioses	19
2.2. Etiologia e ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp.</i>	19
2.3. Manifestações clínicas da LVH	21
2.4. Diagnóstico das leishmanioses: aspectos gerais	22
2.4.1. Diagnóstico laboratorial da LVH	23
2.4.1.1. Diagnóstico Parasitológico	23
2.4.1.2. Diagnóstico Molecular	24
2.4.1.3. Diagnóstico Imunológico	25
2.5. Proteômica e imunoproteômica	27
2.6. Proteínas de trabalho	29
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	33
4.2. Parasitos	33
4.3. Preparo do extrato antigênico de <i>Leishmania infantum</i>	33
4.4. Cultivo de formas amastigotas-like	33
4.4.1. Preparo do extrato total de proteínas	34
4.4.2. Focalização isoeletrica	34
4.4.3. Gel SDS-PAGE 12%	35
4.4.4. Amostras de soros	35
4.5. <i>Immunoblotting</i> e análise dos spots	36
4.6. Extração de spots, digestão proteica e extração dos peptídeos	37
4.7. Espectrometria de Massas por MALDI-TOF/TOF	37
4.8. Identificação das proteínas e pesquisa em banco de dados	38
4.9. Predição de epitopos específicos de linfócitos B	38
4.10. Obtenção e análise das sequências das proteínas selecionadas	38
4.11. Clonagem do gene das proteínas endonuclease III e GTP-binding protein .	39
4.11.1. Extração do DNA genômico dos parasitos	39
4.11.2. Amplificação das sequências gênicas por PCR	39
4.11.3. Ligação do gene em pGEM®-T Vector Systems	40

4.11.4	Preparo e transformação de bactérias <i>Escherichia coli</i> XL1blue.....	40
4.11.5	Extração do DNA plasmidial.....	40
4.11.6	Sequenciamento dos genes	41
4.11.7	Clonagem do gene em vetor de expressão.....	41
4.12	Expressão e purificação das proteínas recombinantes	41
4.13	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	42
4.14	Experimentos de ELISA.....	43
4.15	Acompanhamento sorológico após tratamento	43
4.16	Análise estatística.....	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1.	Apresentação do artigo	45
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	56
7.	PERSPECTIVAS	57
8.	REFERÊNCIAS	58
9.	ANEXOS.....	67
9.1	Comprovantes de aprovação do projeto pelo COEP da UFMG.....	67
10.	APÊNDICES	69
10.1.	Artigos de primeira autoria	69
10.2.	Demais trabalhos publicados durante o Doutorado.....	71

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Grimaldi & Tesh, 1993), e apresentam ampla distribuição geográfica no mundo. São doenças negligenciadas com sintomas que podem variar desde uma lesão cutânea de cura espontânea até a forma visceral da doença, fatal se aguda e não tratada (WHO, 2010). Atualmente, mais de 20 espécies de *Leishmania* que infectam o homem são conhecidas, sendo transmitidas pela picada de flebotomíneos fêmeas infectados.

A doença afeta principalmente pessoas mais pobres nos Continentes Africano e Asiático e na América Latina, sendo associada a situações de desnutrição, moradia precária, sistema imunológico debilitado e falta de recursos (WHO, 2020). Em 2018, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 98 países ou territórios são endêmicos para leishmaniose. Isso inclui 68 países endêmicos para Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT), nove países endêmicos apenas para LV e 21 países endêmicos para LT.

A LV é fatal se deixada sem tratamento em mais de 95% dos casos (WHO, 2020). A doença afeta órgãos como baço, fígado, linfonodos, medula óssea, dentre outros, e é caracterizada por um amplo espectro clínico (Chappuis *et al.* 2007). É caracterizada por crises irregulares de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. Atualmente, a LV representa uma das principais doenças parasitárias com potencial em causar surtos e mortalidade no mundo (WHO, 2020). A doença é causada pelas espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum*, sendo a última a espécie causadora dos casos no Brasil. Ao nível global, a forma antroponótica da doença, sem reservatório animal, é a mais comum. A LV geralmente afeta comunidades pobres em áreas rurais remotas, embora a urbanização seja relatada em alguns países, como o Brasil (Chappuis *et al.*, 2007).

Atualmente, não há uma vacina contra a doença humana, embora vários antígenos venham sendo testados e um grau variável de sucesso tenha sido obtido em modelos murinos e caninos (Giunchetti, *et al.*, 2007; Nico *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2013; Vitoriano-Souza, *et al.*, 2013; Lage, *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015; Lage, *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2018). As medidas mais utilizadas para a prevenção e combate à LV antroponótica se baseiam no controle dos reservatórios e dos vetores, na proteção individual com uso de repelentes e telas de proteção nas casas e, principalmente, no diagnóstico correto e precoce com tratamento efetivo dos doentes (Grimaldi & Tesh,

1993; WHO, 2010). Devido a problemas relacionados ao controle e tratamento da doença, um diagnóstico preciso para a detecção da LV é de extrema importância.

Neste sentido, o diagnóstico da LV é realizado com base em evidências clínicas e epidemiológicas, em conjunto com exames laboratoriais (Tesh, 1995). Dentre as estratégias empregadas, estão as avaliações parasitológicas, moleculares e imunológicas. Métodos imunológicos, como o teste de aglutinação direta, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), imunofluorescência e Western blot, podem ser utilizados para a detecção de anticorpos específicos à doença, sem a necessidade de procedimentos invasivos. Tais técnicas, de forma geral, apresentam elevada sensibilidade, mas a especificidade varia de acordo com o antígeno utilizado. Por serem técnicas de detecção de anticorpos, apresenta m uma limitação comum, que é a não distinção entre infecção ativa e a passada ou curada, o que dificulta o diagnóstico preciso da doença.

O teste de ELISA tem sido usado como método diagnóstico para um vasto número de doenças infecciosas, incluindo as leishmanioses (Sundar & Rai, 2002). Dentre as suas vantagens, está o custo relativamente baixo e o elevado rendimento, possibilitando a análise de várias amostras em uma única placa. Para melhor eficiência, a técnica requer um antígeno altamente específico para capturar os anticorpos gerados pela doença. Os exames sorológicos realizados atualmente para o diagnóstico da LV humana (LVH) no Brasil são o teste rápido (IT LEISH®), que utiliza o antígeno recombinante K39 (rK39) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Estudos demonstram que o IT LEISH® apresenta sensibilidade variando de 92 a 100% e especificidade variando de 80 a 100% para detecção da LV aguda (Peruhype Magalhaes *et al.*, 2012). Dentre os antígenos disponíveis e utilizados no cenário atual, principalmente em áreas endêmicas, ainda são descritos problemas relacionados com a sensibilidade e/ou especificidade dos mesmos, dificultando assim o uso como ferramenta diagnóstica mais adequada e precisa (Georgiadou *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2017). Outro fato importante é que a maioria dos testes não conseguem discriminar pacientes com infecções agudas, crônicas e subclínicas de pacientes curados, não sendo adequados para o diagnóstico de recidivas e ou como teste de prognóstico (Sundar e Singh, 2018).

Dessa forma, a busca por antígenos a serem aplicados em testes diagnósticos de simples produção, manuseio e baixo custo, apresentando elevada sensibilidade e especificidade, torna-se desejável no cenário atual. Estudos vêm sendo realizados no sentido de aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico das leishmanioses (Coelho *et al.* 2012).

Baseado nas informações obtidas pelo sequenciamento dos genomas, uma abordagem experimental na área de Biotecnologia, denominada proteômica, foi criada e, posteriormente, aperfeiçoada. Através da ferramenta proteômica com a correlação de dados imunológicos (imunoproteômica), é possível identificar e descrever processos biológicos, mecanismos de interação e níveis de expressão proteica. Estudos desenvolvidos por nosso e outros grupos de pesquisa sobre imunoproteômica em *Leishmania* já exploraram aspectos relacionados com a biologia do parasito, bem como antígenos com potencial imunogênico e/ou para serem aplicados no diagnóstico da doença humana e canina, além da identificação de proteínas relacionadas à virulência dos parasitos (Coelho *et al.* 2012; Matrangolo *et al.* 2013; Brotherton *et al.* 2014; Magalhaes *et al.* 2014; Duarte *et al.*, 2015).

Nesse contexto, no presente estudo, propõe-se a utilização de uma ferramenta imunoproteômica, até então não explorada em pacientes com LVH em nosso país, baseada na avaliação do perfil de expressão proteica de extratos totais de formas promastigotas em fase estacionária de crescimento e formas amastigotas-like de *Leishmania infantum*. Amostras de soro de pacientes com LV foram utilizadas, com o objetivo de identificar proteínas antigênicas dos parasitos a serem aplicadas como candidatas ao diagnóstico sorológico da doença. Para refinar a seleção dos candidatos, amostras de soro de pacientes com Doença de Chagas e de indivíduos saudáveis residentes em área endêmica da doença foram utilizadas para excluir os pontos de maior reatividade cruzada e buscar antígenos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico da LVH.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecto-parasitárias endêmicas em 98 países, afetando, principalmente, as regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2018). Em relação à LV, a maioria dos casos ocorre no Brasil, na África Oriental e na Índia e estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo anualmente, sendo apenas 25% a 45% relatados à Organização Mundial de Saúde (Bi *et al.*, 2018). Em 2018, mais de 95% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão.

No que diz respeito a LT, cerca de 95% ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central e estima-se que ocorram de 600.000 a 1 milhão de novos casos no mundo anualmente (WHO, 2020). Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde, em 2018, mais de 85% dos novos casos da doença ocorreram em 10 principais países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, República Árabe Síria e Tunísia.

É estimado que 310 milhões de pessoas encontram-se expostas ao risco de contrair a infecção pelo parasito *Leishmania*. O Brasil é responsável por aproximadamente 95% dos casos de LV e 40% dos casos de LT no Continente Americano, fato que exalta a doença como um importante problema de Saúde Pública (Alvar *et al.*, 2012).

O aumento da incidência de casos de leishmaniose na Europa, África, América e Ásia vêm ocorrendo nas últimas décadas devido a uma série de fatores, tais como a expansão do *habitat* dos flebotomíneos devido ao aquecimento global e o aumento do número de casos de cães de áreas não endêmicas, além do aumento do desflorestamento devido à crescente urbanização (Baneth *et al.*, 2008; Palatnik de Souza, 2012).

2.2. Etiologia e ciclo biológico do parasito *Leishmania spp.*

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família *Trypanosomatidae*. O vetor transmissor é um inseto da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, pertencente aos gêneros *Phlebotomus* em países do Velho Mundo e *Lutzomyia nas* Américas, sendo que apenas as fêmeas possuem

hábitos hematófagos sendo assim, capazes de transmitir o parasito aos hospedeiros mamíferos (Grimaldi & Tesh, 1993).

Em seu ciclo biológico, o parasito *Leishmania spp.* pode apresentar-se sob duas formas morfológicas principais: amastigota e promastigota. As formas amastigotas são formas arredondadas, com flagelo rudimentar e cinetoplasto em forma de bastão, sendo parasitos intracelulares obrigatórios e se multiplicando no interior de vacúolos parasitóforos em células do sistema fagocítico-mononuclear dos hospedeiros mamíferos. As formas promastigotas são formas alongadas, afiladas, com um único flagelo que lhes conferem motilidade, cinetoplasto localizado entre a porção anterior e o núcleo e são encontradas no interior do trato gastrointestinal do vetor transmissor. (Sacks & Kamhawi, 2001; Sacks & Sher, 2002).

A transmissão do parasito do hospedeiro mamífero para o vetor ocorre a partir da realização do repasto sanguíneo pela fêmea em um hospedeiro infectado, podendo assim ingerir, juntamente com o sangue, formas amastigotas livres ou células fagocíticas infectadas. Ao alcançarem o intestino do vetor, essas células se rompem e liberam os parasitos, que rapidamente irão se transformar em formas promastigotas procíclicas e migrar para o trato digestório médio e anterior do vetor. Os parasitos passam por um processo de multiplicação e assumem a forma paramastigota, e posteriormente sofrem a diferenciação em formas promastigotas metacíclicas, migrando para a parte anterior do aparelho bucal do inseto.

Quando o vetor já infectado realiza um novo repasto sanguíneo, o mesmo pode regurgitar formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva, que por apresentarem elevada motilidade e capacidade migratória irão penetrar na derme do hospedeiro mamífero não infectado. Em seguida, as células do sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro, sendo principalmente macrófagos, migram para o local podendo fagocitar o parasito que, no interior de fagolisossomos nessas células, irão se diferenciar em formas amastigotas, que por sua vez irão se replicar. A replicação dos parasitos pode resultar no rompimento das células, liberando assim as formas amastigotas no organismo do hospedeiro. Os parasitos liberados podem ser novamente fagocitados, levando à continuidade da infecção e ao desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero. Dessa forma, um novo vetor não infectado pode ingerir as formas do parasito durante o repasto, completando assim o ciclo biológico do parasito (Pessoa & Martins, 1988; Medeiros *et al.*, 2005).

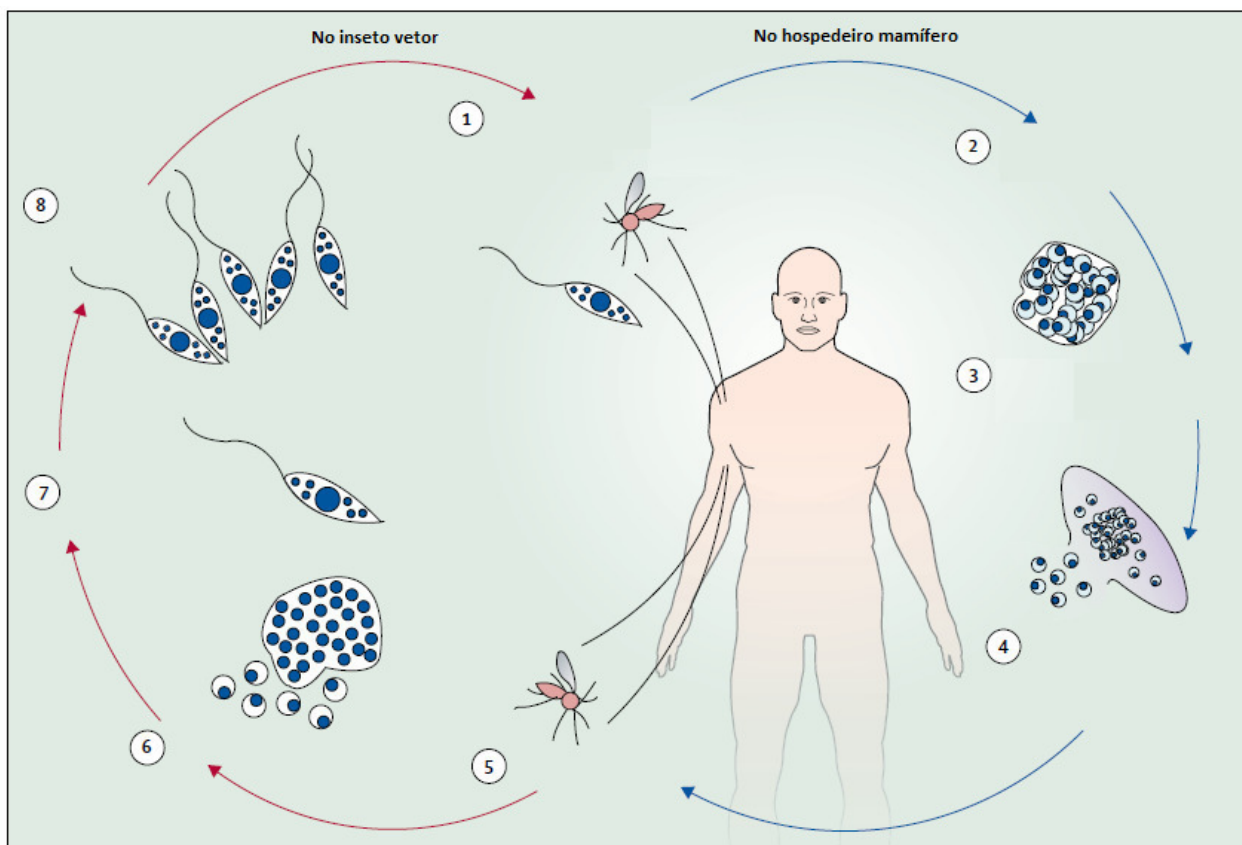


Figura 1: Ciclo biológico do parasito *Leishmania* spp. 1. Introdução de formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro através da picada do vetor infectado. 2 e 3. Fagocitose dos parasitos por macrófagos do hospedeiro, onde ocorre a diferenciação em amastigotas e proliferação. 4. Rompimento da célula hospedeira com liberação das amastigotas, podendo ser fagocitadas por novas células gerando a disseminação dos parasitos. 5 e 6. Realização do repasto sanguíneo no hospedeiro infectado e infecção do inseto vetor fêmea pela ingestão de formas amastigotas ou de células parasitadas. 7. Diferenciação de formas amastigotas em promastigotas no trato digestório do vetor. 8. Multiplicação, diferenciação em formas promastigotas metacíclicas e migração para a probóscide do vetor. (Adaptado de Burza *et al.* 2018).

2.3. Manifestações clínicas da LVH

A LV é uma infecção disseminada causada principalmente pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*. Excepcionalmente, já foi observada a ocorrência de visceralização de infecções por espécies tipicamente associadas à LT. Tal fato foi relatado com as espécies *Leishmania tropica* no Oriente Médio e *Leishmania amazonensis* na América do Sul.

O parasito atinge o sistema reticuloendotelial, com infiltração do baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos causando organomegalia e pancitopenia (Griensven & Diro, 2012). Após um período de incubação, que geralmente varia entre dois a seis meses, indivíduos sintomáticos apresentam sinais de uma infecção sistêmica e persistente, podendo apresentar sintomas como febre, fadiga, fraqueza perda de peso e hepatoesplenomegalia que persiste por meses (Herwaldt, 1999; Murray *et al.*, 2005;

Chappuis *et al.*, 2007; Griensven & Diro, 2012). Outros sintomas geralmente presentes são anemia, trombocitopenia e neutropenia, refletindo a supressão da medula óssea e o sequestro esplênico. Linfadenopatia e a ocorrência de aumentos moderados nas enzimas hepáticas também podem ser documentados. Além disso, os pacientes com LV podem apresentar um alto risco de infecções adicionais (Griensven & Diro, 2012). Sem tratamento, a LV é quase universalmente fatal.

Devido ao fato de a intensidade das manifestações clínicas da doença ser variável, muitos indivíduos podem permanecer assintomáticos por um longo tempo, o que dificulta seu diagnóstico clínico, embora cerca de 20% dos pacientes infectados desenvolvam a forma aguda e sintomática da doença. Os sintomas são progressivos e as complicações decorrentes da evolução da infecção são responsáveis pela elevada letalidade da doença (Badaró *et al.*, 1986; Gama *et al.*, 2004).

2.4. Diagnóstico das leishmanioses: aspectos gerais

O diagnóstico das leishmanioses é realizado com base em evidências clínicas e epidemiológicas, em conjunto com exames laboratoriais (Tesh, 1995). A correta e precoce detecção de casos, seguida do tratamento adequado, é fundamental para a contenção da doença. Embora a LV seja geralmente diagnosticada clinicamente principalmente em áreas endêmicas, tratando-se de uma doença com amplo espectro clínico, na maioria das vezes os sinais e sintomas são inconclusivos e confundidos com outras doenças, tornando seu diagnóstico bastante complexo. (Srividya *et al.*, 2012; Abbas *et al.*, 2015).

Dessa forma, a utilização de métodos laboratoriais confiáveis torna-se obrigatória para um diagnóstico preciso e posterior controle efetivo da doença. (Davies *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2011). Dentre as estratégias empregadas para o diagnóstico da LV estão diversas técnicas, como a demonstração do parasito em tecidos, culturas *in vitro*, técnicas sorológicas e moleculares (Sundar & Rai., 2002; Savoia *et al.*, 2015, Sakkas *et al.*, 2016).

Um teste diagnóstico ideal deve ser capaz de realizar a distinção de pacientes com a infecção aguda, crônica e assintomática, daqueles já curados. Além disso, um teste diagnóstico satisfatório, deve apresentar uma elevada sensibilidade e especificidade, bem como uma fácil padronização, execução e custo acessível (Srivastava *et al.*, 2011).

2.4.1. Diagnóstico laboratorial da LVH

A detecção do agente causador de toda doença infecciosa é um passo determinante para o manejo clínico e/ou monitoramento da doença. As leishmanioses representam um desafio para o diagnóstico clínico e laboratorial e um motivo de preocupação constante da saúde pública mundial, pois o número de casos de falha terapêutica ao tratamento convencional tem aumentado (Alvar *et al.* 2006). Os métodos de diagnóstico direto, que demonstram a presença do parasito no indivíduo doente, são considerados ideais para o diagnóstico da doença, entretanto, a prática apresenta limitações, que podem ser compensadas por métodos indiretos baseados na resposta imunológica dos hospedeiros infectados (Kar, 1995).

2.4.1.1. Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico se baseia na visualização direta do parasito por exame microscópico de aspirados de órgãos, como baço, medula óssea, fígado ou nódulos linfáticos, após fixação em lâmina e coloração de Giemsa ou Leishman, e/ou isolamento do parasito em culturas *in vitro* (Sundar & Rai, 2002 ; Chappuis *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2011). No Brasil, recomenda-se principalmente a punção aspirativa da medula óssea para realização do exame direto e isolamento do parasito *in vitro* (MS, 2014). Este teste permanece sendo o padrão ouro no diagnóstico de LV atualmente devido à sua alta especificidade. No entanto, trata-se de um procedimento doloroso e invasivo, além de apresentar limitações como a ocorrência de sensibilidade variável de acordo com a amostra coletada, a intensidade da infecção e a exigência de conhecimento técnico para sua realização (Reis *et al.*, 2006; Sakkas *et al.*, 2016).

A especificidade da técnica de microscopia é elevada, mas sua sensibilidade varia entre aspirados do baço (93% a 99%), medula óssea (52% a 85%) e linfonodo (52% – 58%) (Griensven & Diro, 2012). A realização de isolamento em cultura celular em meios enriquecidos, é capaz de melhorar a sensibilidade do teste, podendo atingir até 80%, a partir de aspirados do baço ou medula óssea. Entretanto, a técnica é restrita pois além de elevar o custo do teste, o crescimento em cultura pode ser demorado, prolongando bastante o resultado do mesmo (Sundar & Rai, 2002; Griensven & Diro, 2012; Sakkas *et al.*, 2016).

Novas técnicas permitiram o aumento da sensibilidade nos métodos de cultura do parasito. O desenvolvimento do método de cultura em microcapilar (MCM), por exemplo, apresentou sensibilidade de 100% utilizando aspirados de medula óssea e de 77,8 a 100%

utilizando sangue periférico (Allahverdiyev *et al.*, 2005; Srividya *et al.*, 2012). Descobertas promissoras foram também relatadas com um método de microcultura a partir da diluição de frações de amostras de sangue periférico, com o uso de leucócitos e células mononucleares (PBMCs), para o isolamento do parasito. A técnica apresentou melhoria na sensibilidade, variando de 84 a 91,5%, além de ser menos invasiva e apresentar um crescimento mais rápido em cultura (Hyde *et al.*, 2007; Maurya *et al.*, 2010; Elmahallawy *et al.*, 2014).

2.4.1.2. Diagnóstico Molecular

Técnicas de diagnóstico molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR-Real Time ou PCR quantitativa (qPCR), também têm sido cada vez mais utilizados para o diagnóstico da LV. Tais testes têm se tornado cada vez mais relevantes devido aos notáveis valores de sensibilidade e especificidade, além da variedade de opções de amostras que podem ser testadas e, também devido às limitações que muitas vezes apresentam os métodos parasitológicos e sorológicos convencionais (Srividya *et al.*, 2012; Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015). Os testes moleculares visam a detecção de ácidos nucleicos do parasito nos aspirados de órgãos como baço, fígado, medula óssea e linfonodos. Entretanto, muitas vezes, há a ocorrência de problemas relacionados às amostras coletadas, que podem não conter parasitos e prejudicar a sensibilidade do teste, bem como a necessidade de treinamento técnico especializado e a possibilidade de contaminação com agentes externos podendo ocasionar resultados falso-positivos. Além disso, trata-se de um teste que apresenta custo elevado e tem-se a necessidade de uma boa estrutura laboratorial (Sundar & Rai, 2002; Srivastava *et al.*, 2011; Sakkas *et al.*, 2016.).

Estudos recentes demonstraram uma elevada sensibilidade (>95%) do teste de PCR em amostras de medula óssea, sangue periférico e amostras leucocitárias (de Ruiten *et al.*, 2014). A PCR em sangue periférico tem sido recomendada como um teste de triagem principalmente em pacientes imunocomprometidos, uma vez que se trata de um teste não invasivo. (Antinori *et al.*, 2007; Griensven & Diro, 2012).

Um problema apresentado pela PCR convencional é a ocorrência de positividade em indivíduos saudáveis de regiões endêmicas. Além disso, sua maior desvantagem, bem como a de testes sorológicos, é a incapacidade de diferenciar a doença clinicamente ativa e infecções assintomáticas. Essas desvantagens podem ser superadas pela PCR quantitativa (Sudarshan *et al.*, 2014). A PCR quantitativa em tempo real também é capaz de permitir a quantificação da carga parasitária na amostra avaliada, o que poderia auxiliar

na determinação da doença ativa e proporcionar sua utilização como um marcador prognóstico (Mary et al., 2006). Ambos os testes, qualitativos e quantitativos também podem ser empregados para avaliar a cura, visto que geralmente tornam-se negativos após o tratamento. (Boelaert *et al.*, 2004).

2.4.1.3. Diagnóstico Imunológico

A LV é caracterizada por uma resposta imune humoral significativa, apresentando elevada produção de anticorpos. Dessa forma, métodos imunológicos empregando diferentes antígenos, têm sido utilizados em ensaios para a detecção de anticorpos específicos ao parasito, demonstrado um potencial no diagnóstico sorológico da LV. Dentre os ensaios para o diagnóstico imunológico da LV, destacam-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o Western blot, o teste de aglutinação direta (DAT, do inglês *Direct Agglutination Test*), o teste de anticorpo fluorescente indireto (IFAT, do inglês *Indirect Fluorescent Antibody Test*), o ensaio de hemaglutinação indireta (IHA, do inglês *Indirect Hemagglutination Test*), o ensaio imunoenzimático (ELISA, inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e os testes imunocromatográficos (Chappuis *et al.*, 2007; Elmahallawy *et al.*, 2014; Savoia *et al.*, 2015).

De maneira geral, as técnicas imunológicas apresentam uma elevada sensibilidade, entretanto sua especificidade apresenta variações de acordo com o antígeno empregado. Como se tratam de técnicas de detecção de anticorpos, uma limitação comum pode ser destacada, que é a não distinção entre a infecção ativa ou passada. Essa limitação dificulta o diagnóstico da doença, pois, em áreas endêmicas para LV, indivíduos saudáveis portadores de infecção assintomática ou mesmo aqueles já tratados para a doença, podem apresentar níveis detectáveis de anticorpos (Ryan *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2011; Gidwani *et al.*, 2011). Embora o desempenho varie entre estudos, metodologia e antígenos utilizados, a maioria deles combina sensibilidade e especificidade razoáveis (entre 80% a 100%) (Sundar & Rai, 2002). Ainda que antígenos brutos tenham sido amplamente empregados, seu uso apresenta limitações. Dessa forma, nos últimos anos, diversas proteínas recombinantes têm sido avaliadas no diagnóstico sorológico da LV (Sakkas *et al.*, 2016; Griensven & Diro, 2019).

O exame imunológico mais utilizado no Brasil é a imunofluorescência indireta (MS, 2014). O kit de RIFI disponibilizado para o SUS é o IFI Leishmaniose Humana – Bio-Manguinhos, produzido pela Fiocruz. Estudos demonstraram que este teste apresentou valores de sensibilidade e especificidade variando de 88 a 92% e 80 a 83,8%,

respectivamente (Pedras *et al.*, 2008; Machado de Assis *et al.*, 2012; Peruhype Magalhaes *et al.*, 2012). Embora os reagentes utilizados na RIFI sejam acessíveis, trata-se de uma técnica que exige técnicos treinados e infraestrutura laboratorial, o que limita seu uso na maioria das áreas endêmicas (Griensven & Diro, 2012). A ocorrência de reatividade cruzada com outras doenças, principalmente Doença de Chagas, devido à proximidade filogenética entre os parasitos *Leishmania* e *Trypanosoma*, também é um fator limitante desta técnica (Elmahallawy *et al.*, 2014; Sakkas *et al.*, 2016).

Outro teste amplamente utilizado no Brasil é o teste imunocromatográfico rápido (IT LEISH®), utilizando o antígeno recombinante K39 (rK39). Estudos demonstraram que o IT LEISH® possui sensibilidade variando de 92 a 100% e especificidade variando de 80 a 100% (Machado de Assis *et al.*, 2008; Peruhype Magalhaes *et al.*, 2012). Trata-se de um grande avanço no diagnóstico da LV, sendo um teste de simples execução, exigindo um treinamento mínimo e que não requer laboratório ou equipamento especializado. Pode ser realizado em campo e em diferentes níveis dos serviços de saúde, com amostras de sangue total, soro ou plasma, além de fornecer o resultado entre 10 a 20 minutos. Entretanto, o kit não possibilita a distinção entre casos ativos ou recidiva em pacientes tratados, portanto, sua interpretação deve sempre ser em conjunto com a definição do caso clínico (WHO, 2008).

O teste de ELISA vem sendo uma ferramenta diagnóstica para diversas doenças infecciosas, incluindo as leishmanioses (Sundar *et al.*, 2002). Dentre as vantagens do método está o custo relativamente baixo e o elevado rendimento, possibilitando a análise de várias amostras em uma única placa. Entretanto, para melhor eficiência e confiabilidade, tem-se a necessidade de um antígeno altamente específico para capturar os anticorpos gerados pela doença. Um fator importante e limitante é que a técnica requer uma certa infraestrutura laboratorial (Elmahallawy *et al.*, 2014).

A utilização de antígenos não purificados, como o extrato solúvel bruto de *Leishmania* (SLA), pode ocasionar uma baixa especificidade devido a reações cruzadas no teste. Para minimizar esse problema, a identificação de proteínas do parasito e a sua aplicação na técnica de ELISA em sua forma recombinante tem demonstrado elevado potencial na detecção de anticorpos da doença (Maalej *et al.*, 2003; Sakkas *et al.*, 2016). Dentre estas proteínas, o antígeno recombinante K39 (rK39), descrito pela primeira vez em 1993 (Burns *et al.*, 1993), tem sido amplamente utilizado nos testes diagnósticos atuais. Sendo assim, o desempenho da rK39 na detecção de anticorpos por ELISA, foi avaliado em diversos trabalhos, demonstrando valores de sensibilidade variando de 93,3

a 100% e especificidade de 82,5 a 100% (Badaro *et al.*, 1996; Braz *et al.*, 2002; Maalej *et al.*, 2003; Machado de Assis *et al.*, 2012; Pedras *et al.*, 2008; Abass *et al.*, 2015).

Com base neste cenário e em resultados promissores de outras proteínas recombinantes, a busca por antígenos a serem aplicados em testes diagnósticos de simples produção, manuseio e baixo custo, visando elevar ainda mais a sensibilidade e especificidade dos testes, ainda é de grande importância atualmente. Além disso, ainda vemos a necessidade da melhoria nos parâmetros de eficiência dos testes principalmente em áreas endêmicas para LV, visando o aumento na distinção de indivíduos saudáveis, de portadores de infecção assintomática ou daqueles já tratados para a doença.

2.5. Proteômica e imunoproteômica

A proteômica envolve a aplicação de tecnologias para a identificação e quantificação do conteúdo global das proteínas presentes em uma célula, tecido ou organismo. Ela tem como objetivo avaliar proteínas expressas em um sistema biológico, seja por sua atividade, estrutura, estado pós-traducional ou outra modificação (Domon *et al.*, 2006). A técnica complementa outras tecnologias como a genômica e a transcriptômica, visando expor a identidade de proteínas de um organismo ou conhecer a estrutura e funções de uma proteína específica. A tecnologia da proteômica pode ser aplicada em diferentes áreas da pesquisa, como na detecção de marcadores de diagnóstico, candidatos para a produção de vacinas, compreensão de mecanismos de patogenicidade, no estudo da alteração de padrões de expressão em resposta a diferentes sinais e na interpretação da função de vias proteicas em diferentes doenças (Aslam *et al.*, 2016). A análise proteômica é realizada inicialmente através da confecção de géis bidimensionais (2-DE). Para tal, é realizado o preparo das amostras proteicas, seguido da focalização isoeletrica das proteínas e, por fim, da segunda dimensão através da eletroforese em SDS-PAGE (Figura 2).

A imunoproteômica é uma técnica baseada na combinação da tecnologia desenvolvida para o proteoma, com a correlação de dados imunológicos e a posterior finalização das análises *in silico* utilizando genomas publicados, como os de *Leishmania spp.* O uso da imunoproteômica, associando fluidos biológicos, tais como amostras de soro, pode permitir a identificação de antígenos envolvidos no desenvolvimento de doenças, conduzindo assim à identificação de alvos biológicos. (Fernandes *et al.*, 2012). Estudos já exploraram a proteômica para análise da expressão proteica e sua relação com a biologia do parasito *Leishmania spp.*, bem como para a avaliação de antígenos com

potencial imunogênico e/ou para serem aplicados no diagnóstico sorológico da doença humana e canina; além da identificação de proteínas relacionadas à virulência dos parasitos (Coelho *et al.* 2012; Matrangolo *et al.* 2013; Brotherton *et al.* 2014; Magalhaes *et al.* 2014; Duarte *et al.*, 2015).

Diversas proteínas foram identificadas por meio dessa ferramenta, dentre elas, proteínas já descritas na literatura, como alvos diagnósticos, e candidatos vacinais contra as leishmanioses visceral e/ou tegumentar. A análise proteômica de diferentes espécies de *Leishmania* já possibilitou a identificação de diversas proteínas dos estágios promastigota e amastigota desse parasito (Coelho *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2015). Algumas destas proteínas, como LiHyp1, LiHyp6, HRF, LiHyD, proibitina e eukaryotic elongation factor-1 beta, dentre outras identificadas em *L. infantum* por anticorpos de cães com LV demonstraram ter um potencial vacinal em camundongos BALB/c, induzindo uma elevada produção das citocinas IFN- γ , IL-12 e GM-CSF, e uma produção reduzida de IL-4 e IL-10. Além disso, também apresentaram um alto potencial antigênico para o diagnóstico da leishmaniose, com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade (Martins *et al.*, 2013, 2015; Lage *et al.*, 2015, 2016; Dias *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2019).

Proteínas foram também identificadas pela técnica de imunoproteômica em extratos protéicos do parasito *L. braziliensis* utilizando soros de pacientes com LT (Duarte *et al.*, 2015). Algumas destas proteínas demonstraram elevado potencial no sorodiagnóstico da doença, bem como uma alta capacidade imunogênica em camundongos BALB/c (Duarte *et al.*, 2016; 2017; Santos *et al.*, 2017).

Dessa forma, com o conhecimento adquirido em imunoproteômica e sabendo das limitações para o sorodiagnóstico da LVH, o presente trabalho propôs avaliar, por meio da combinação das técnicas de eletroforese bidimensional, immunoblotting e espectrometria de massas; e utilizando amostras de soros de pacientes com LV; proteínas antigênicas do parasito *L. infantum*, para serem empregadas no sorodiagnóstico da doença.

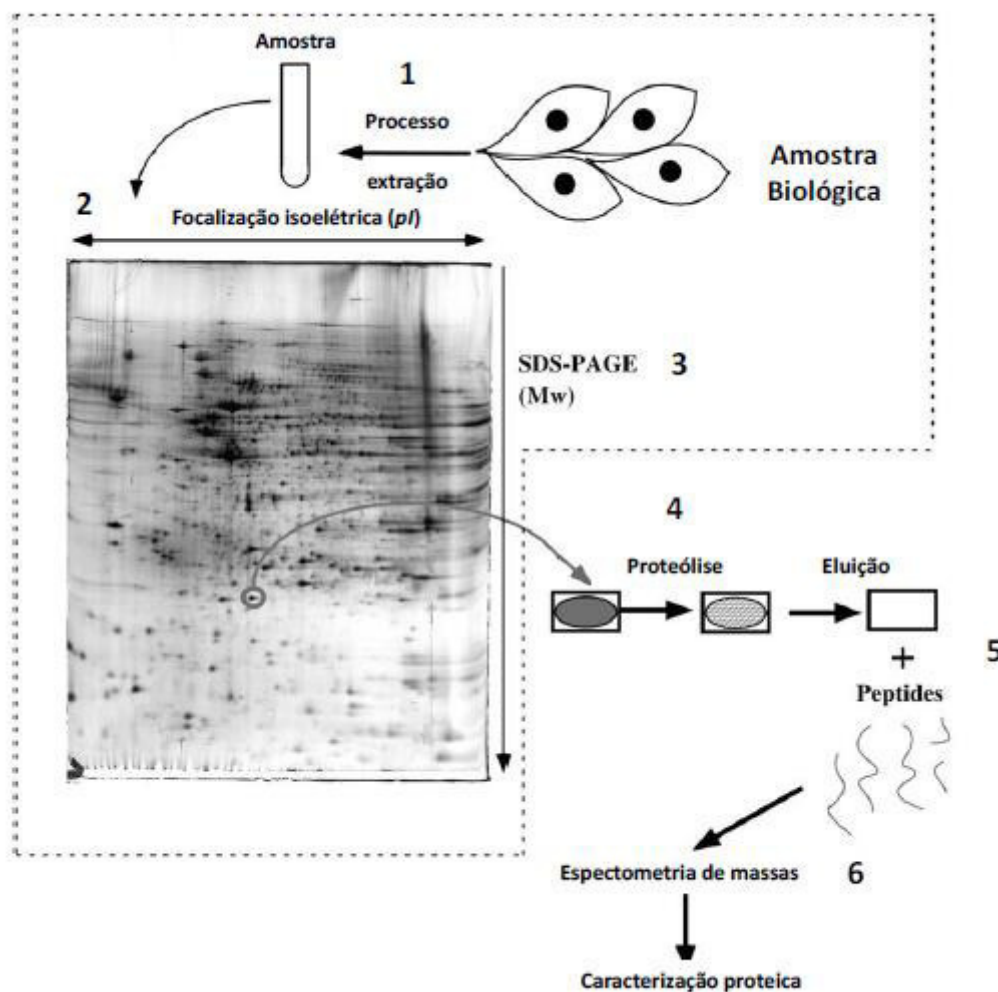


Figura 2: Eletroforese em gel 2-DE. O processo se inicia a partir da extração total de proteínas da amostra biológica (1). Após a etapa de focalização isoeletrica (IEF) (2), as proteínas chegam ao seu ponto isoeletrico onde não possuem carga elétrica restante. As proteínas são equilibradas em um tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), de modo que todas elas ficam carregadas negativamente. Após a focalização, as proteínas são submetidas a uma corrida em gel de SDS-PAGE, sendo então separadas de acordo com as suas massas moleculares (3). Após a detecção das proteínas nos géis, as imagens são analisadas para determinar quantitativamente os *spots* de interesse. Os *spots* são excisados e submetidos à digestão com tripsina (4), e os peptídeos resultantes são eluídos (5) e analisados por espectrometria de massas, para identificação e caracterização das proteínas (6) (Adaptado de: Rabilloud & Lelong 2011).

2.6. Proteínas de trabalho

Para a validação do experimento de imunoproteômica, duas proteínas identificadas neste estudo nas formas promastigotas de *L. infantum* foram clonadas, expressas, purificadas e avaliadas como candidatas a antígenos marcadores para o diagnóstico da LVH. A partir de análises de bioinformática, confirmou-se a presença de epitopos específicos para linfócitos B nas proteínas demonstrando dessa forma seu potencial antigênico.

A proteína endonuclease III (rENDO) (LINF_090005600) possui uma sequência de 259 aminoácidos (Figura 3), os quais conferem a ela um peso molecular de aproximadamente 29 kDa. A proteína se trata de uma glicosilase de reparo de DNA, conhecida por sua atividade de reparo no dano oxidativo de pirimidinas (Mishra *et al.*, 2018), além de também ter sido relatada como alvo terapêutico (Moreira *et al.*, 2017).

A proteína GTP-binding protein (rGTP) (LINF_250020400) possui uma sequência de 216 aminoácidos com peso molecular de 24 kDa (Figura 4). As proteínas ligantes de GTP são consideradas fatores de virulência em *Leishmania* e seu envolvimento na resistência a drogas contra espécies do parasito já foi descrito na literatura. Tais moléculas participam das vias de secreção e/ou resposta ambiental dos parasitos, bem como na comunicação com a célula hospedeira durante a infecção (Ishemgulova *et al.*, 2017).

Ambas as proteínas são conservadas em diferentes espécies de *Leishmania*, entretanto, apesar de também estarem presentes em outras espécies de Tripanossomatídeos, elas apresentam divergências na sequência e as regiões nas quais os epitopos são encontrados em *Leishmania* não apresentam ou apresentam baixa homologia com os demais organismos.

10	20	30	40	50	60
MSKHSFTPPS	NWAQLFARLE	DYRKHLLAPV	DTMGCHRLHD	ENAPKEVQRF	QTLVALMLSA
70	80	90	100	110	120
QTKDIVTATA	MDALIKRGLT	AQSIHAMTTT	ELDMHICKVG	FHNTKVKHIK	EVAAILIKDY
130	140	150	160	170	180
GGKVPREYEE	LIALPGVGPK	MANLFFQDAD	HRTVGIGVDT	HVHRISQRYR	WVPSTVKTPE
190	200	210	220	230	240
DTRKALESWL	PQKHWTINS	LMVGLGQTV	TPLYPKCGIC	ELSDICPNAF	KEVQQKGLRT
250					
KAPTERRQEP	VPQKKRRIK				

Figura 3: Sequência de aminoácidos da proteína Endonuclease III (Fonte: Banco de dados Uniprot).

10	20	30	40	50	60
MQQAPSDCVA	SFKLILVGDG	GTGKTTFVKR	HLTGEFEKRY	VATVGVDVHP	LTFHTNRGKI
70	80	90	100	110	120
CFNCWDTAGQ	EKFGGLRDGY	YVEGQCAIIM	FDVTSRNTYK	NVPMWYRDIT	RVCDNIPIVL
130	140	150	160	170	180
VGNKVDCADR	QVKAKMITFH	RKKGLQYYDI	SAKSNYNFEK	PFVWLAKKLA	NDPELMLVEV
190	200	210			
PMLDTDVVAL	TAEQVAALEA	EQQAMANAPL	PMGDDE		

Figura 4: Sequência de aminoácidos da proteína GTP binding (Fonte: Banco de dados Uniprot).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Utilizar a técnica de imunoproteômica para identificar proteínas antigênicas nas formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania infantum* que possam ser aplicadas no diagnóstico da leishmaniose visceral humana.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar experimentos de *immunoblotting* em extratos protéicos de formas promastigotas em fase estacionária de crescimento e amastigotas-like de *L. infantum* utilizando amostras de soros de pacientes com LV para a pesquisa de proteínas que sejam reconhecidas por anticorpos presentes em tais amostras. Usar amostras de pacientes com Doença de Chagas e indivíduos saudáveis para reduzir a seleção de proteínas com reatividade cruzada.
- Identificar e caracterizar, por espectrometria de massas e sequenciamento, as proteínas que forem reconhecidas pelos anticorpos presentes nas amostras de soros dos pacientes com LV.
- Avaliar o potencial de proteínas selecionadas para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral humana.
- Avaliar a eficácia prognóstica das proteínas selecionadas utilizando, para tal, amostras de soros de pacientes com LV antes e seis meses após o tratamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG) com os números de processo CAAE-323431.14.9.0000.5149. e CAAE 67820516.8.1001.5149.

4.2 Parasitos

A espécie *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) foi utilizada. 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, 200U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4. Os parasitos foram cultivados a 24°C e 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 a -196°C.

4.3 Preparo do extrato antigênico de *Leishmania infantum*

O extrato solúvel antigênico (SLA) de *L. infantum*, foi preparado como descrito previamente por Coelho *et al.* (2003). As culturas de formas promastigotas de *L. infantum* foram quantificadas e centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos (min). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com PBS 1x estéril; sendo que uma nova centrifugação foi realizada a 2.000 x g por 10 min, a 4°C. Esse passo foi realizado por três vezes. Após a última centrifugação, o *pellet* foi congelado a -80°C até o momento do preparo do SLA.

4.4 Cultivo de formas amastigotas-like

Para a obtenção das formas amastigotas-like, 1×10^9 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum* foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 min, e lavadas com PBS 1x estéril. Após a lavagem, o *pellet* formado foi ressuscitado em 5 mL de soro fetal bovino inativado e incubado por 48 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Após o período, as culturas contendo as formas amastigotas-like foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 min e, posteriormente, lavadas três vezes com PBS 1x

estéril. O pellet foi congelado a -80°C , até o momento do uso. A morfologia dos parasitos foi observada em microscópio óptico binocular.

4.4.1 Preparo do extrato total de proteínas

O extrato total de formas promastigotas estacionárias e amastigotas-*like* de *L. infantum*, assim como os géis bidimensionais, foram realizados utilizando os protocolos modificados de Lewis *et al.* (2000) e Coelho *et al.* (2012). Os parasitos (10^{10} células) foram lavados três vezes em solução de Tris-HCl 40 mM, pH 7.2, por meio de centrifugação a $5000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Os pellets foram ressuspensos em tampão de lise contendo 7M de ureia, 2M de tiourea, 4% de colamidopropil dimetilamônio-1-propanossulfonato (CHAPS), ditiotretol 40 mM (DTT), 2% de tampão IPG (pH 4-7), 40 mM de Tris e coquetel inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail, GE Healthcare). As amostras foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e agitadas com auxílio de um vortex ocasionalmente. A purificação foi realizada por precipitação de proteínas usando o kit 2D Clean UpKit (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. A concentração do extrato proteico total obtido foi realizada por meio do kit 2-D Quant-Kit (GE Healthcare), e alíquotas foram congeladas a -80°C até o momento do uso.

4.4.2 Focalização isoeletrica

Para a eletroforese de primeira dimensão, 150 μg de extrato total de proteínas foi adicionado a um volume final de 250 μL de solução de reidratação (GE Healthcare, Upsala, Sweden) com 1% de tampão de imobilização de gradiente de pH (IPG-buffer, pH 4-7). Posteriormente, as amostras foram aplicadas nas *strips* (7 cm, pH 4-7; GE Healthcare) para hidratação passiva à temperatura ambiente. Após a hidratação do gel por, no mínimo, 12 horas e, no máximo, 20 horas; a focalização isoeletrica foi realizada utilizando o equipamento Ettan IPGphor 3 system, a 300 V por 200 V/h; 1.000 V por 300 V/h; 5.000 V por 4.800V/h; e mantendo a 5.000 V por 3.000 V/h. Após a focalização, cada *strip* foi incubada por 15 min em uma solução contendo 50 mM de Tris-HCl, pH 8,8; 6 M de ureia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) de SDS, 0.002% de azul de bromofenol, e 125mM de DTT visando a redução das proteínas; seguido de uma segunda incubação com a mesma solução utilizando 125 mM de iodacetamida no lugar do DTT, que promove a alquilação das proteínas.

4.4.3 Gel SDS-PAGE 12%

As *strips* foram transferidas para um gel 12% de poliacrilamida e seladas com solução contendo agarose (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.1% SDS, 0.5% agarose, 0.002% bromophenol blue), tendo sido utilizado o padrão de peso molecular de proteínas (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen). A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e 0.1% de SDS, em pH 8), sob voltagem constante de 30 mA/gel. O sistema Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell - BioRad foi utilizado para a eletroforese. Os géis 2-DE foram corados com Comassie Brilhante G-250, conforme descrito (Neuhoff *et al.* 1988).

4.4.4 Amostras de soros

Para os experimentos de *immunoblotting*, amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de LVH (n=15) e soros de indivíduos não infectados que residem em área endêmica da doença (n=15, Belo Horizonte) foram utilizados. O diagnóstico foi confirmado por meio de parâmetros clínicos, sorológicos e pelo diagnóstico parasitológico por PCR de aspirados do baço ou medula óssea. Além disso, nenhum dos pacientes havia sido tratado quando do momento da coleta das amostras. Os indivíduos não infectados, não apresentavam nenhum sinal clínico ou suspeita de leishmaniose, sendo então utilizados como controles. Soros de pacientes com doença de Chagas foram também utilizados como controle para reatividade cruzada (n=15). A infecção foi confirmada por hemocultura e pela associação com o kit de ELISA recombinante Chagatest® v.4.0kit, e pelo kit de inibição da hemoaglutinação Chagatest® (Wiener Lab., Rosario, Argentina).

Para os experimentos de ELISA para validação de antígenos selecionados, foram obtidas amostras de soro de pacientes com LV (n=30, incluindo 16 homens e 14 mulheres com idades entre 29 e 63 anos), coletadas em região endêmica da doença (Belo Horizonte). Os pacientes foram diagnosticados por avaliação clínica, sorológica e demonstração da presença de kDNA de *L. infantum* em aspirados do baço ou medula óssea pela técnica de PCR. Soros de indivíduos sadios residentes em área endêmica de LV (n=30, incluindo 18 homens e 12 mulheres com idades entre 21 e 56 anos; Belo Horizonte) e não endêmica da doença (n=30, incluindo 15 homens e 15 mulheres com idades variando de 19 a 49 anos; Poços de Caldas) foram também utilizados. Tais indivíduos não apresentavam sinais clínicos da doença e mostraram resultados sorológicos negativos. Também foram obtidas amostras de soros de pacientes com doença

de Chagas (n=25, incluindo 15 homens e 10 mulheres com idades entre 29 e 60 anos), com infecção confirmada por hemocultura, Kit ELISA recombinante Chagatest® v.4.0 recombinante ou pelo kit de inibição de hemaglutinação Chagatest® (Wiener Lab., Rosario, Argentina).

Amostras de pacientes com Paracoccidioidomicose (n=10, incluindo seis homens e quatro mulheres com idades variando de 26 a 55 anos) foram também utilizadas no estudo. O diagnóstico foi realizado por exame clínico e cultura positiva de *Paracoccidioides*. Amostras de soros de pacientes com Hanseníase (n=20, incluindo 12 homens e oito mulheres, com idades de 24 a 57 anos), com diagnóstico confirmado por avaliação clínica, teste rápido de ML Flow e histopatologia da lesão, bem como amostras de pacientes com Aspergilose (n=10, incluindo cinco homens e cinco mulheres, com idades entre 22 e 47 anos), Tuberculose (n=10, incluindo seis homens e quatro mulheres com idades variando de 38 a 67 anos) e Malária (n=10, incluindo sete homens e três mulheres com idades de 20 a 46 anos) também foram utilizadas.

4.5 Immunoblotting e análise dos spots

Para seleção dos *spots* de proteínas por *immunoblotting*, o extrato total de formas promastigotas ou amastigotas-like de *L. infantum* foram separados por géis 2-DE e transferidos para membranas de nitrocelulose (Schleicher & Schull, Dassel, Germany), em tampão de transferência por 2 horas e a 400 mA. As membranas foram bloqueadas com 5% (p/v) de leite em pó desnatado, diluído em solução TBS-T (20 mM de Tris, 200 mM de NaCl e 0,05% de Tween 20), por 2 horas e à temperatura ambiente. Após, as membranas foram lavadas cinco vezes (10 minutos cada lavagem) com uma solução de TBS-T e incubadas separadamente com os pools de soros de pacientes com LV, de indivíduos saudáveis de área endêmica de LV e de pacientes com doença de Chagas. As amostras foram diluídas em TBS-T a 2% (p/v) em leite em pó desnatado (1:400), e uma incubação foi processada por 2 h, à temperatura ambiente. Após, as membranas foram lavadas cinco vezes (10 minutos cada) com TBS-T e incubadas com conjugado anti-IgG humano ligado a peroxidase (Anti-Human IgG whole molecule-peroxidase antibody, Sigma Aldrich; 1:5.000, diluído em TBS-T) por 2 horas e à temperatura ambiente. Após, as membranas foram lavadas cinco vezes com TBS-T, e a revelação dos *spots* reativos foi realizada utilizando o reagente ECLTM Western Blotting Detection e o equipamento ImageQuant LAS4000 device (GE Healthcare). Para a análise dos géis, os mesmos foram escaneados utilizando o ImageScanner III (GE Healthcare) e os *spots* que foram

reconhecidos apenas pelos soros de pacientes com LV foram extraídos manualmente para a posterior identificação das proteínas. Os géis 2-DE e *immunoblots* foram realizados em triplicata.

4.6 Extração de spots, digestão proteica e extração dos peptídeos

Os *spots* selecionados foram excisados manualmente e os fragmentos foram descorados em solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8.0. Em seguida, foi realizada a desidratação do gel adicionando 200 μ L de solução de acetonitrila 100%. Após a desidratação, os fragmentos foram incubados com 50 μ L de solução de protease (20 ng/mL de tripsina em 25 mM bicarbonato de amônio; Promega, USA), por 30 min e em banho de gelo. O excesso da solução de proteases foi removido e trocado por solução de 25 mM de bicarbonato de amônio. A digestão foi realizada por 18 horas e a 37°C. A extração dos peptídeos foi realizada duas vezes por 15 minutos utilizando 30 μ L de uma solução composta por 50% de acetonitrila e 5% de ácido fórmico. O material foi concentrado em Speed-Vac (Savant, USA), para um volume de 10 μ L. As amostras foram passadas em colunas de Zip-Tip (C18 resin; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA), para a remoção dos sais. A eluição dos peptídeos da coluna ocorreu em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0.1%. As amostras foram armazenadas em freezer -20°C, para posterior análise por espectrometria de massas.

4.7 Espectrometria de Massas por MALDI-TOF/TOF

Para determinar o espectro de MS dos spots selecionados, os peptídeos excisados dos géis foram colocados em AnchorChips de 600 μ m (Bruker Daltonics). As amostras (1 μ L) foram aplicadas em duplicata, na placa de MALDI e, em seguida, foi adicionada uma matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 5 mg/mL, diluído em 3% TFA e 50% acetonitrila, que continha 2 mM de fosfato de amônio. Todas as amostras foram deixadas secar ao ar em temperatura ambiente e, 0,1% de TFA foi usado para lavagem. Todas as amostras foram analisadas sob modo de operação refletido/positivo, por meio de um espectrômetro de massa MALDI TOF / TOF Ultraflex III (Bruker, Daltonics, Alemanha). Os espectros de massas foram adquiridos após 200 disparos de laser consecutivos, a uma frequência de 100 Hz e a detecção das massas foi realizada na faixa de 1000 a 4000 m/z. As massas dos peptídeos foram medidas como massas monoisotópicas. Os picos de MS com as maiores intensidades foram selecionados para análise de fragmentação por MS/MS.

4.8 Identificação das proteínas e pesquisa em banco de dados

Os espectros resultantes foram processados e visualizados usando software FlexAnalysis, versão 2.4 (Bruker Daltonics). As sequências de aminoácidos das proteínas e dos peptídeos foram comparadas com outras sequências disponíveis no banco de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) com a seleção do organismo *Leishmania* (taxid:5658). Espectros de baixa qualidade não foram considerados para a pesquisa no banco de dados, sendo apenas utilizadas sequências confiáveis de peptídeos sequenciados para a correta identificação por alinhamento. As sequências dos peptídeos foram estendidas para o local mais próximo de clivagem trípica e a coincidência entre as massas teórica e experimental, além da qualidade do alinhamento foram consideradas como critérios para identificação. De acordo com os resultados obtidos, os seguintes parâmetros para seleção das proteínas foram utilizados: “*total score, query coverage e E value*”.

4.9 Predição de epitopos específicos de linfócitos B

Epitopos lineares específicos para linfócitos B foram preditos em algumas proteínas de *L. infantum* identificadas nas formas promastigotas deste estudo, a fim de verificarmos a presença de peptídeos específicos e verificar a possibilidade de utilização das proteínas em experimentos de ELISA. Para tal, ferramentas de bioinformática e o software Bepipred 1.0, foram utilizados (Larsen *et al.*, 2006). Duas proteínas foram selecionadas, clonadas, expressas e purificadas para a posterior validação do seu potencial antigênico no diagnóstico sorológico da LVH em experimentos de ELISA.

4.10 Obtenção e análise das sequências das proteínas selecionadas

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos das proteínas Endonuclease III (LinF_090005600) e GTP-binding protein (LinF_250020400) foram obtidas no banco de dados do TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). Para analisar a conservação da proteína dentro o genoma de outros organismos foi realizado um alinhamento através da ferramenta de bioinformática BLAST. Partindo da sequência gênica codificadora das proteínas, dois pares de iniciadores foram desenhados para permitir a amplificação dos genes de interesse, por meio da técnica de PCR. Os primers *Forward* e *Reverse* (Eurofins mwg/operon), descritos abaixo, foram desenhados de acordo com a sequência da região ORF do DNA genômico para *L. infantum*. Sítios para as enzimas de restrição *NheI* e *BamHI* foram adicionados.

Endonuclease III

F → (5'- TGCTGCTAGCATGAGTAAACACTCCTTT -3')

R → (5'- TCATGGATCCTCACTTTATGCGTCTCTT -3')

GTP-binding protein

F → (5'- TGCTGCTAGCATGCAACAGGCACCCT -3')

R → (5'- TCATGGATCCTCACTCGTCATCGCCCAT -3')

4.11 Clonagem do gene das proteínas endonuclease III e GTP-binding protein

4.11.1 Extração do DNA genômico dos parasitos

A cepa MHOM/BR/1970/BH46 de *L. infantum* foi cultivada de acordo com protocolo descrito por Coelho *et al.* (2003). O DNA genômico foi extraído conforme com o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Para verificar a qualidade e a quantidade do material obtido, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% peso por volume (p/v) em tampão TAE (constituído de Tris 40mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM). O gel foi submetido a uma corrente de 80 volts (V) e corado com brometo de etídio (10 µg/mL). A dosagem do DNA foi realizada no equipamento NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™) e a amostra armazenada a -80°C.

4.11.2 Amplificação das sequências gênicas por PCR

A região codificadora das proteínas foi amplificada por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores complementares aos fragmentos. Sítios de restrição para as enzimas *NheI* e *BamHI* foram inseridos na sequência dos genes que codificam ambas as proteínas. A reação de amplificação do gene de interesse foi realizada utilizando o kit GoTaq DNA Polymerase, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). A termociclagem foi padronizada em um termociclador (T100™ Thermal Cycler, BioRad), utilizando-se os seguintes parâmetros:

Passo 1 – Desnaturação a 95°C por 5 min.

Passo 2 – Desnaturação a 95°C por 45 seg;

Anelamento a 55°C por 45 seg;

Extensão a 72°C por 120 seg.

} 30 ciclos

Passo 3 – Extensão final a 72°C por 5 min.

Após a reação, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O produto da PCR foi extraído do gel por meio do kit *Invisorb® Fragment CleanUp* (Invitex) e quantificado utilizando o aparelho NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™).

4.11.3 Ligação do gene em pGEM®-T Vector Systems

Os produtos da amplificação dos genes das proteínas Endonuclease III (rENDO) e GTP-binding protein (rGTP) foram ligados individualmente ao vetor de clonagem pGEM®-T *Vector Systems* de acordo com as instruções do fabricante (Promega). A ligação do inserto ao vetor ocorreu a 4°C, durante 16 h.

4.11.4 Preparo e transformação de bactérias *Escherichia coli* XL1blue

Células competentes *E. coli* XL1blue foram preparadas através da técnica de cloreto de cálcio, segundo Sambrook *et al.* (1989). A transformação das bactérias XL1blue foi realizada através de choque térmico com os plasmídeos pGEM-rENDO e pGEM-rGTP e plaqueadas individualmente em meio Luria Bertani (LB) sólido (Tryptona 10g/L, Extrato de levedura 5g/L e Cloreto de Sódio 5g/L acrescido de 15g/L de ágar) como sugerido pelo fabricante (Agilent Technologies).

4.11.5 Extração do DNA plasmidial

Após a incubação das placas por 16 h a 37°C, clones positivos foram selecionados a fim de se realizar a extração dos seus DNAs plasmidiais. As colônias selecionadas foram replicadas em meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) e seus DNAs plasmidiais extraídos através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Os produtos do Miniprep foram quantificados no aparelho NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™) e a digestão dos plasmídeos foi realizada com as endonucleases de restrição *NheI* e *BamHI* (Promega) de acordo com protocolo do fabricante (Promega). Os produtos foram confirmados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e as respectivas bandas obtidas foram excisadas e purificadas com o kit *Invisorb® Fragment CleanUp* (Invitex).

4.11.6 Sequenciamento dos genes

Após a clonagem em vetor pGEM-T[®], amostras dos plasmídeos purificados foram separadas para a realização do sequenciamento automático de DNA de alta qualidade e para a confirmação da identidade dos insertos e dos vetores (pGEM-T). O sequenciamento foi realizado em *MegaBACE 1000 DNA Sequencing System* (GE Healthcare).

4.11.7 Clonagem do gene em vetor de expressão

Os insertos e o plasmídeo de expressão [ENDO - pET28a (+) (Addgene) e GTP - pET28a (+)] foram digeridos com as enzimas de restrição descritas no item 3.14.5 de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A amostra foi confirmada em gel de agarose 1% e purificada com o kit *Invisorb[®] Fragment CleanUp* (Invitek). A ligação foi realizada com a enzima T4 ligase, como sugerido pelo fabricante (Promega). Para a transformação por choque térmico, bactérias BL21 (DE3; Agilent Technologies, USA) foram utilizadas, seguindo o protocolo sugerido pelos fabricantes e plaqueadas em meio de cultura LB sólido acrescido de antibióticos específicos. As colônias crescidas na placa foram selecionadas e replicadas em meio de cultura LB, com os devidos antibióticos e então foram submetidas à reação de PCR utilizando 2 pg de iniciadores específicos para a região T7 do vetor e a enzima GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega) para confirmar a presença do amplicon no sítio de clonagem. Um gel de agarose 1% foi realizado para a confirmação da presença dos insertos. Alíquotas das bactérias transformadas e que continham os insertos foram estocadas em glicerol 15% e a -80°C.

4.12 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Para verificar a cinética de expressão das proteínas, foi realizado um experimento piloto utilizando 10 mL de cultura das bactérias transformadas. Após a densidade óptica (DO) das culturas alcançarem aproximadamente uma leitura de 0.4 a 0.6, em comprimento de onda de 600nm, uma alíquota de 1 mL foi removida, sendo correspondente ao tempo não induzido. As culturas foram induzidas com 0,5 mM de IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, Promega), e alíquotas de 1 mL foram retiradas 1, 2, 3 e 4 horas após a indução para posterior confirmação da expressão em gel

SDS-PAGE. As proteínas foram expressas em maior concentração após um período de 3 h de indução, em temperatura de 37°C.

Para a purificação em larga escala, a expressão da proteína foi realizada em 2L de cultura. A lise das bactérias foi realizada em sonicador (Desruptor de Célula Ultrassônico - Modelo: DES500 - Unique) com 6 pulsos de 90MHz. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em colunas de níquel e as amostras finais obtidas foram dialisadas frente a PBS 1x. As proteínas também foram submetidas à purificação por gel filtração (Superdex™ 200- GE Healthcare) e em seguida, passadas em uma coluna de agarose-polimixina (Sigma), para remoção de qualquer endotoxina residual da bactéria. As amostras purificadas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% para confirmação do peso molecular e dosadas pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA) utilizando o kit *BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As amostras obtidas nos ensaios de expressão e purificação foram submetidas à separação por eletroforese em géis desnaturantes (SDS-PAGE 12,5%) em sistema de eletroforese vertical, Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad). Os géis de separação foram preparados utilizando as soluções Bis-acrilamida 40%, diluída a 12,5% v/v e 1,5 M de Tris-HCl pH 8.8, 0,4% de SDS. A polimerização dos géis ocorreu com a adição de 0,5% (v/v) de persulfato de amônio e 0,05% (v/v) de TEMED. Os géis de concentração foram preparados 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 (125 mM Tris hidroximetil aminometano, SDS 2% v/v, Azul de Bromofenol, Glicerol P.A. 60% v/v e β -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. 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, os géis foram incubados 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

descolorante (ácido acético 10%, metanol 30% e água destilada 60%), possibilitando a visualização das bandas proteicas no gel.

4.14 Experimentos de ELISA

Foram realizadas curvas de titulação para determinar as concentrações apropriadas dos antígenos e as diluições dos anticorpos primário e secundário a serem utilizadas nos testes. Para avaliar a capacidade diagnóstica dos dois antígenos selecionados nos experimentos de imunoproteômica placas de 96 poços (Nunc, Nunclon®) foram sensibilizadas por 16 horas a 4°C com os antígenos rENDO, rGTP e SLA *L.infantum* (nas concentrações de 0,5 µg, 0,25 µg e 1,0 µg por poço, respectivamente) diluídos em tampão de sensibilização (carbonato de sódio 0,1 M e bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9.6), volume final de 100 µL por poço. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com 250 µL de solução de PBS 1x 0,05% Tween 20 (PBS-T), acrescido de 5% de albumina sérica bovina (BSA) por 1 hora e a 37°C. Após o bloqueio, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem (PBS-T) e, em seguida, 100 µL da diluição dos soros humanos (diluídos previamente a 1:400 em PBS-T acrescido de 0,25% de BSA) foram adicionados aos poços e a incubação ocorreu por 1 hora e a 37°C. As placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e, em seguida, 100 µL do anticorpo anti-IgG humano peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), diluído 1:20.000 em PBS-T 0,25% de BSA, foram adicionados aos poços e a incubação ocorreu novamente por 1 hora e a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com a solução de lavagem e, posteriormente, 100 µL da solução reveladora composta por 10 mL de tampão citrato-fosfato (Na₂HPO₄ 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 2 µL de H₂O₂, foram adicionados aos poços. 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 H₂SO₄ 2N. Os valores de DO foram lidos em um leitor de microplacas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá), usando 492 nanômetros como comprimento de onda.

4.15 Acompanhamento sorológico após tratamento

Para avaliar a reatividade sorológica das proteínas rGTP e rENDO em experimentos de ELISA após o tratamento dos pacientes, amostras de soros de pacientes com LV tratados e não tratados foram coletadas (n=10, incluindo seis homens e quatro

mulheres, com idades entre 32 e 57 anos) antes e seis meses após o tratamento usando antimoniais pentavalentes (Glucantime, Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brasil). Todos os pacientes foram submetidos ao mesmo regime terapêutico, utilizando o medicamento na dose de 20 mg Sb⁵⁺ por kg, durante 30 dias, e nenhum deles sofria de outras infecções ou apresentava doenças pré-existentes. Após o fim do tratamento, todos os pacientes se apresentaram livres de qualquer sintoma de doença. Os níveis de anticorpos IgG foram determinados antes e após o tratamento frente as proteínas recombinantes e ao SLA de *L. infantum* como controle.

4.16 Análise estatística

Os resultados foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0) e analisados no GraphPad Prism TM (versão 6.0 para Windows). Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) foram construídas para obtenção da sensibilidade, especificidade, área sobre a curva (AUC) e o likelihood ratio (LR); bem como o ponto de corte do teste (cut-off). As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas entre os grupos. As diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados sob a forma de artigo científico publicado, 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).

5.1. Apresentação do artigo

LAGE, D.P.; LUDOLF, F.R.; SILVEIRA, P.C.; MACHADO, A.S.; RAMOS, F.F.; DIAS, D.S.; RIBEIRO, P.A.F.; COSTA, L.E.; VALE, D.L.; TAVARES, G.S.V.; MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; CALIGIORNE, R.B.; CHAVES, A.T.; GONÇALVES, D.U.; ROCHA, M.O.C.; DUARTE, M.C.; COELHO, E.A.F. **Screening diagnostic candidates from *Leishmania infantum* proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach.** v. 146, n. 11, p. 1467–1476, 2019 DOI: 10.1017/S0031182019000714.



Research Article

Cite this article: Lage DP *et al.* (2019). Screening diagnostic candidates from *Leishmania infantum* proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach. *Parasitology* 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000714>

Received: 24 February 2019

Revised: 11 April 2019

Accepted: 12 May 2019

Key words:

Humans; immunoproteomics; *Leishmania infantum*; recombinant proteins; serodiagnosis; visceral leishmaniasis

Author for correspondence:

Eduardo A. F. Coelho, E-mail: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

Screening diagnostic candidates from *Leishmania infantum* proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach

Daniela P. Lage¹, Fernanda Ludolf¹, Patrícia C. Silveira¹, Amanda S. Machado¹, Fernanda F. Ramos¹, Daniel S. Dias¹, Patrícia A. F. Ribeiro¹, Lourena E. Costa¹, Danniele L. Vale¹, Grasielle S. V. Tavares¹, Vívian T. Martins¹, Miguel A. Chávez-Fumagalli¹, Rachel B. Caligiorno², Ana T. Chaves¹, Denise U. Gonçalves¹, Manoel O. C. Rocha¹, Mariana C. Duarte¹ and Eduardo A. F. Coelho^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ²Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil and ³Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Abstract

There is no suitable vaccine against human visceral leishmaniasis (VL) and available drugs are toxic and/or present high cost. In this context, diagnostic tools should be improved for clinical management and epidemiological evaluation of disease. However, the variable sensitivity and/or specificity of the used antigens are limitations, showing the necessity to identify new molecules to be tested in a more sensitive and specific serology. In the present study, an immunoproteomics approach was performed in *Leishmania infantum* promastigotes and amastigotes employing sera samples from VL patients. Aiming to avoid undesired cross-reactivity in the serological assays, sera from Chagas disease patients and healthy subjects living in the endemic region of disease were also used in immunoblottings. The most reactive spots for VL samples were selected, and 29 and 21 proteins were identified in the promastigote and amastigote extracts, respectively. Two of them, endonuclease III and GTP-binding protein, were cloned, expressed, purified and tested in ELISA experiments against a large serological panel, and results showed high sensitivity and specificity values for the diagnosis of disease. In conclusion, the identified proteins could be considered in future studies as candidate antigens for the serodiagnosis of human VL.

Introduction

Leishmaniasis is a disease complex considered as a public health problem in tropical and subtropical regions in the world, such as Asia, Africa and the Americas. It is caused by obligate protozoan parasites of the genus *Leishmania*, occurring in 98 countries with 12 million people clinically affected, and 350 million at risk of infection (WHO, 2016). Visceral leishmaniasis (VL) is caused by parasites of the *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* species, and it can be fatal if acute and left untreated (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Regarding the treatment of disease, pentavalent antimonials, liposomal and free amphotericin B, paromomycin, pentamidine and oral miltefosine are used. However, these drugs are toxic and/or present high cost (Alves *et al.*, 2018; Kapil *et al.*, 2018). As a consequence, the prevention of disease should be considered, such as by use of vaccination (Kumar and Samant, 2016). Although a number of antigens have been tested, and a variable degree of success has been obtained in murine and/or canine models, there is no effective vaccine to protect against human disease (Nico *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2013; Grimaldi *et al.*, 2014; Mortazavidehkordi *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2018).

The control of VL requires appropriate diagnosis and adequate treatment, since the precise diagnosis is essential for effective drug regimen for patients (Vijayakumar and Das, 2018). Laboratory strategies are being employed, such as parasitological and immunological evaluations. Parasitological methods include microscopy with the identification of amastigote forms in organ aspirates, such as bone marrow, spleen, liver and/or lymph nodes. However, limitations due to the variable sensitivity, the requirement of technical expertise, the sample's collect be considered an invasive procedure, limit their efficacy (Sakkas *et al.*, 2016). Immunological methods have been used; however, problems related with the sensitivity and/or specificity of the selected antigens are described; thus hampering their use as more appropriate diagnostic tools (Georgiadou *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2017).

A commercial kit, Kalazar Detect™ Test (InBios International, Inc., Seattle, Wash, USA), is an immunochromatographic assay applied for the diagnosis of human VL. However, this test

cannot discriminate between current, subclinical or past infections, and it is useless for diagnosis of relapses and as a prognostic test (Sundar and Singh, 2018). As a consequence, the possibility to identify new antigens to be employed in more sensitivity and specific diagnosis should be pointed (Didwania et al., 2017). Proteomics is a technology employed for the study and characterization of the information obtained in a cell or organism about the form of protein pathways and networks (Vlahou and Fountoulakis, 2005; Garg et al., 2018). Using proteomics associated with biological fluids, such as sera samples, can allow for the identification of antigens involved in the development of diseases; thus leading to the identification of biological targets that could be used as diagnostic markers and/or vaccine candidates (Fernandes et al., 2012). Indeed, and due to the high amino acid conservation in *Leishmania* proteins; the identification of antigenic molecules that stimulate the humoral response in infected hosts could help for the development of more appropriated tests employing these more refined antigens (Jamal et al., 2017). In this context, in the present study, an immunoproteomics approach performed in *L. infantum* promastigote and amastigote protein extracts with sera samples of VL patients was developed; with the purpose of identifying antigenic proteins in the parasites to be applied as candidates for the diagnosis of disease. To refine the selection of the candidates, sera samples of Chagas disease patients and healthy subjects living in the endemic region were used to exclude the most cross-reactive spots, aiming to avoid undesired cross-reactivity in the serological assays.

Materials and methods

Human samples

Sera samples were obtained from VL ($n = 30$, including 16 males and 14 females with ages ranging from 29 to 63 years) patients, which were collected from the endemic region of disease (Belo Horizonte). Patients were diagnosed by clinical evaluation and demonstration of *L. infantum* kDNA in spleen or bone marrow aspirates by PCR technique. Sera were also collected from healthy individuals living in an endemic ($n = 30$, including 18 males and 12 females with ages ranging from 21 to 56 years; Belo Horizonte) or non-endemic ($n = 30$, including 15 males and 15 females with ages ranging from 19 to 49 years; Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil) region of leishmaniasis. Subjects did not present clinical signal of disease and showed negative serological results. Samples were also obtained from Chagas disease ($n = 25$, including 15 males and 10 females with ages ranging from 29 to 60 years) patients, with the infection confirmed by hemoculture, Chagatest® recombinant ELISA v.4.0 kit or Chagatest® haemagglutination inhibition kit (Wiener Lab., Rosario, Argentina). Sera from paracoccidioidomycosis ($n = 10$, six males and four females with ages ranging from 26 to 55 years) patients were also used. The diagnosis was performed by clinical examination and positive *Paracoccidioides* culture. Samples collected from leprosy ($n = 20$, with 12 males and eight females, with ages ranging from 24 to 57 years) patients, with the diagnosis confirmed by clinical evaluation, ML Flow rapid test and lesion histopathology, as well as sera from aspergillosis ($n = 10$, including five males and five females, with ages ranging from 22 to 47 years), tuberculosis ($n = 10$, six males and four females with ages ranging from 38 to 67 years) or malaria ($n = 10$, seven males and three females with ages ranging from 20 to 46 years) patients were used in the assays.

Parasites and preparation of *Leishmania* protein extract

Leishmania infantum (MHOM/BR/1970/BH46) was used. Parasites were cultured at 24 °C in complete Schneider's medium

(Sigma), which was supplemented with 20% inactivated foetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 20 mM L-glutamine, 200 U mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin, at pH 7.4 (Coelho et al., 2003). To obtain the axenic amastigotes, 10⁹ stationary promastigotes were washed three times in sterile phosphate buffer saline (PBS 1×), and incubated in 5 mL FBS for 48 h at 37 °C. Parasites were washed in cold PBS 1×, and their morphology was evaluated after staining by the Giemsa method in an optical microscope (Valadares et al., 2011). The protein extraction and two-dimensional electrophoresis (2DE) were performed following a modified protocol (Lewis et al., 2000). Briefly, cells from each stage (10¹⁰ cells) were washed three times in 40 mM Tris-HCl, pH 7.2, by centrifugation at 5000 × g for 10 min at 4 °C. Pellets were resuspended in lysis buffer solution [7 M urea, 2 M thiourea, 4% cholamidopropyl dimethylammonio-1-propanesulfonate (CHAPS), 40 mM dithiothreitol (DTT), 2% IPG buffer (pH 4–7), 40 mM Tris], and a protease inhibitor cocktail (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was added. Samples were incubated for 1 h at room temperature, with occasional vortexing. Purification was carried out by protein precipitation using a 2D Clean UpKit (GE Healthcare), according to manufacturer instructions. Whole cell extracts were measured by a bidimensional Quant-Kit (GE Healthcare), and aliquots were immediately frozen at –80 °C, until use.

Isoelectric focusing (IEF) and SDS-PAGE

For the first-dimension electrophoresis, 150 µg of protein extract was added to a volume of 250 µL with a rehydration solution [7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 40 mM DTT, 2% immobilized pH gradient (IPG-buffer, pH 4–7, trace bromophenol blue)]. Next, samples were applied to IPG strips (13 cm, pH 4–7; GE Healthcare) for passive rehydration overnight at room temperature. After in-gel rehydration for 12 h, isoelectric focusing was performed at 500 V for 1 h, 1.000 V for 1 h, and 8.000 V for 8 h, using a Multiphor II electrophoresis unit and EPS 3500 XL power supply (Amersham, Piscataway, NJ, USA). After IEF, each strip was incubated for 15 min in a solution made up of 10 mL of a 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.002% bromophenol-blue and 125 mM DTT, followed by a second incubation step in the same buffer solution, excluding DTT, which was replaced by 125 mM iodacetamide. IPG strips were transferred to a 12% polyacrylamide and sealed with agarose solution (agarose and bromophenol blue in a Tris-glycine cathode buffer). The protein standard was purchased from Invitrogen (BenchMark™ Protein Ladder). Electrophoresis was performed in a Mini-Protean II system (BioRad) connected to a MultiTemp II cooling bath (Amersham Biosciences), in a Tris/glycine/SDS buffer. Proteins were separated at 200 V, until the dye front had reached the bottom of the gel.

Immunoblottings and protein identification

To select the best spots, immunoblottings were performed using *L. infantum* promastigote and amastigote protein extracts. For this, they were separated electrophoretically and transferred onto cellulose membranes (Schleicher and Schull, Dassel, Germany) by semi-dry blotting for 2 h at 400 mA. Then, membranes were blocked in 5% (w/v) low-fat dried milk in PBS 1× plus 0.05% Tween 20 for 2 h at room temperature. Next, they were washed seven times (10 min, each) with blocking solution and incubated with sera pools from VL ($n = 15$) or Chagas disease ($n = 10$) patients, as well as with sera pool from healthy individuals ($n = 15$) living in the endemic region of disease. All pools were performed at 1:400 in PBS 1× plus 0.05% Tween 20, and the incubation occurred for 2 h at room temperature. After,

membranes were incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-human IgG secondary antibody (1:10 000 diluted), for 1 h at room temperature. After having been washed seven times with PBS 1× plus 0.5% Tween 20, blots were revealed by the addition of chloronaphthol, diaminobenzidine and H₂O₂ 30 vol. Bidimensional gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250, according described (Neuhoff *et al.*, 1988). The stained gels were scanned using an ImageScanner III (GE Healthcare), and spots mainly recognized by antibodies in sera from VL patients were excised from the gels for protein identification. Three independent preparations were performed using independent parasite cultures, and one representative preparation is shown.

Protein digestion, peptide extraction and spot handling

Spots were excised, and fragments were washed in 25 mM ammonium bicarbonate/50% acetonitrile until completely destained. After drying, gel fragments were placed on ice in a 50 μ L protease solution (20 ng mL⁻¹ of a sequence grade-modified trypsin in a 25 mM ammonium bicarbonate) (Promega Biosciences, CA, USA) for 30 min. Excess protease solution was removed and replaced by 25 mM ammonium bicarbonate, when the digestion was performed for 18 h at 37 °C. Peptide extraction was performed twice for 15 min, using 30 μ L of 50% acetonitrile/5% formic acid. Trypsin (Promega) digests were concentrated in a Speed-Vac (Savant, USA) to approximately 10 μ L and desalted using Zip-Tip (C18 resin; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA). Samples were mixed with a matrix (5 mg mL⁻¹ recrystallized α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) in a volume of 1 mL (1:1 ratio), and spotted for MALDI-TOF/TOF Ultraflex III (Bruker, Daltonics, Germany).

Protein identification and database search

To determine the MS spectrum of the selected spots, the digests were spotted onto 600 μ m Anchorchips (Bruker Daltonics). Spotting was achieved by pipetting, in duplicate, 1 μ L of analyte onto the MALDI target plate, then adding 5 mg mL⁻¹ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid diluted in 3% TFA/50% acetonitrile, which contained 2 mM ammonium phosphate. The Bruker peptide calibration mixture was spotted down for external calibration. All samples were allowed to air dry at room temperature, and 0.1% TFA was used for on-target washing. All samples were analysed in the positive-ion, reflection mode, through a MALDI-TOF/TOF Ultraflex III mass spectrometer (Bruker, Daltonics, Germany). Each spectrum was produced by accumulating data from 200 consecutive laser shots, with a frequency of 100 Hz, and an *m/z* range of 1.000–4.000. Instrumental calibration was achieved by using peptide calibration standard II (Bruker Daltonics), a mixture of angiotensin I and II, substance P, bombesin, ACTH clip 1–17, ACTH clip 18–39 and somatostatin 28, as the internal standard. Peptide masses were measured as monoisotopic masses. The MS peaks with the highest intensities were selected for MS/MS fragmentation analyses. The resulting spectra were processed using Flex analysis software, version 2.4 (Bruker Daltonics), with the following settings: peak detection algorithm set at SNAP (Sort Neaten Assign and Place), S/N threshold at 3, precursor and product ion tolerances were set at 0.5 Da, and quality factor threshold at 50. The trypsin autodigestion ion peaks (842.51, 1045.56, 2211.10 and 2225.12 Da) were used as internal standards to validate the external calibration procedure. Matrix, and/or autoproteolytic trypsin fragments, and known contaminants (i.e. keratins) were manually removed. The resulting peptides list was used to search in the NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) for the organism option of *Leishmania* (taxid: 5658). According to the obtained results, and using the peptide

sequences identified for each protein, the following parameters were used as selection criteria: total score, query coverage and *E* value.

Cloning and purification of the parasite proteins

To evaluate the antigenic potential of selected proteins in the immunoproteomics, two antigens, endonuclease III (LINF_090005600) and GTP-binding protein (LINF_250020400) were cloned, expressed, purified and evaluated in ELISA experiments for the serodiagnosis of VL. For this, genes were cloned from *L. infantum* DNA by using the 5'-TGCTGCTAGCATGAGTAAACACTCCTT T-3' (forward) and 5'-TCATGGATCCTCACTTTATGCGTCTCT T-3' (reverse) for endonuclease III, and 5'-TGCTGCTAGCATGCA ACAGGCACCCT-3' (forward) and 5'-TCATGGATCCTCACTC GTCATCGCCCAT-3' (reverse) for GTP-binding protein. The restriction enzymes used were *Bam*HI and *Nhe*I. The DNA fragments were excised from gels, purified and linked into pGEM[®]-T Vector Systems (Promega, USA), and recombinant plasmids were used to transform *Escherichia coli* XL1-Blue competent cells. Positive clones were propagated and used for construction of the expression vector. DNA fragments obtained from digestion of pGEM-rENDO and pGEM-rGTP plasmids were ligated into pET28a-TEV, and *E. coli* BL21 cells (DE3; Agilent Technologies, USA) were transformed with the recombinant plasmids. Gene insertion was confirmed by PCR and sequencing by using the MegaBace 1000 automatic sequencer apparatus (Amersham Biosciences, USA). For the expression and purification of the proteins, cells were induced with IPTG (0.5 μ M) and cultures were shaking at 200 \times g per min for 24 h at 12 °C. Cells were ruptured by using six cycles of ultrasonication with cycles of 30 s each (38 MHz), followed by six cycles of freezing and thawing. After, cellular debris was removed by centrifugation, and recombinant proteins were purified onto a HisTrap HP affinity column connected to an AKTA system (GE Healthcare, USA). The eluted fractions containing the rENDO (29.0 kDa) and rGTP (24.0 kDa) proteins were concentrated in Amicon[®] ultra15 centrifugal filters 10 000 NMWL (Millipore, Germany), and further purified on a Superdex[™] 200 gel-filtration column (GE Healthcare Life Sciences, USA). After, recombinant proteins were passed through a polymyxin-agarose column (Sigma) to remove any residual endotoxin content.

ELISA experiments

Previous titration curves were performed to determine the most appropriate antigen concentration and antibody dilution to be used. Falcon flexible microtitre immunoassay plates (Becton Dickinson) were coated with rENDO, rGTP or *L. infantum* SLA (0.5, 0.25 and 1.0 μ g per well, respectively), which were diluted in 100 μ L of coating buffer (50 mM carbonate buffer) pH 9.6, for 16 h at 4 °C. Next, free binding sites were blocked using 250 μ L of PBS-T (PBS 1× plus Tween 20 0.05%) plus 5% non-fat dry milk (catalogue M7409-1BTL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), for 1 h at 37 °C. After washing plates five times with PBS-T, they were incubated with 100 μ L of human sera (1:400 diluted in PBS-T), for 1 h at 37 °C. Plates were washed seven times in PBS-T, and incubated with anti-human IgG horse-radish-peroxidase conjugated antibody (1:20 000 diluted in PBS-T; catalogue SAB3701282; Sigma-Aldrich, USA) for 1 h at 37 °C. After washing plates seven times with PBS-T, reactions were developed by incubation with 100 μ L per well of a solution composed by 2 μ L H₂O₂, 2 mg *ortho*-phenylenediamine and 10 mL citrate-phosphate buffer, at pH 5.0; for 30 min in the dark. Reactions were stopped by adding 25 μ L 2 N H₂SO₄, and optical density (OD) values were read in an ELISA microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada), at 492 nm.

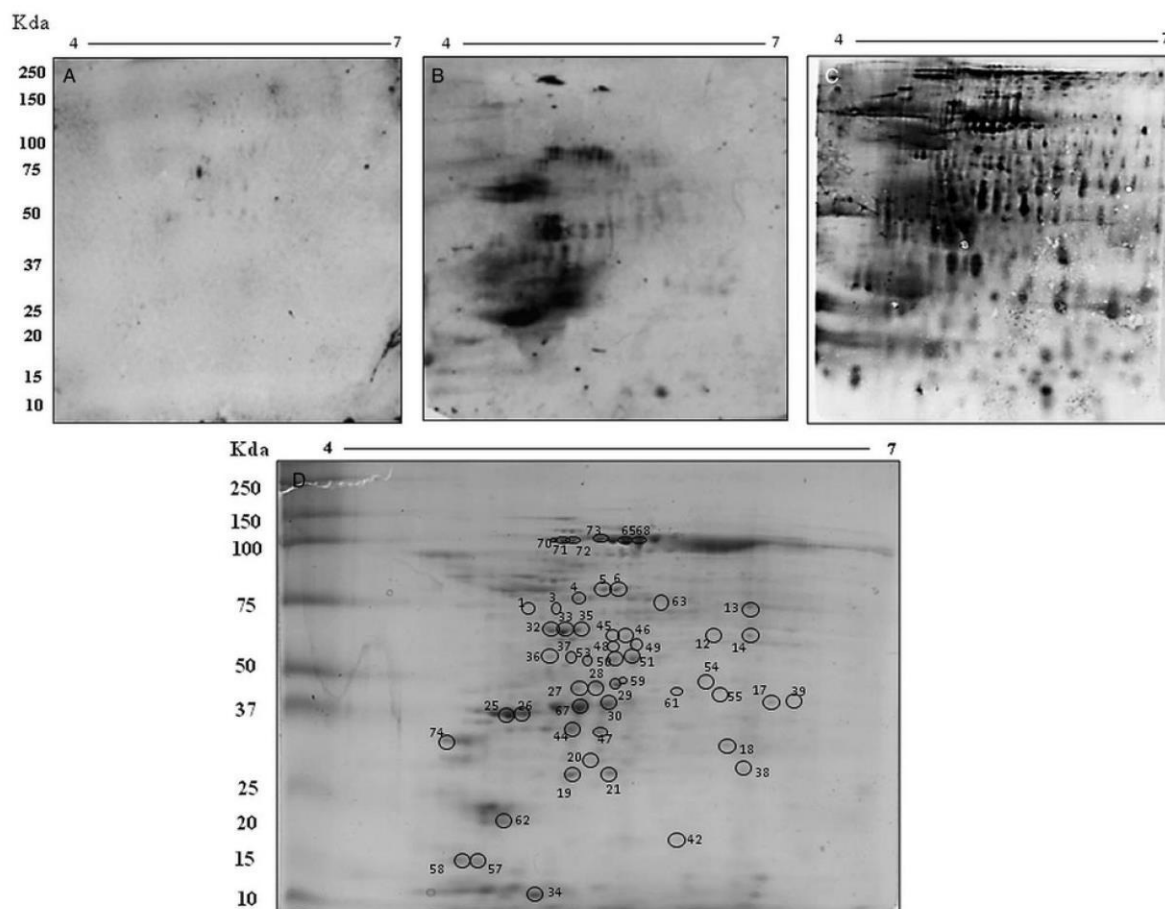


Fig. 1. Two-dimensional profile and immunoproteomic analysis in *L. infantum* promastigote protein extracts. Bidimensional gels were obtained after separation of promastigote protein extracts of the parasites (150 μ g) by using in the first dimension: IEF pH range 4–7, and second dimension: 12% SDS-PAGE. After, they were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250. Immunoblots were developed after incubation of membranes with sera pools from healthy subjects (A), Chagas disease (B) or visceral leishmaniasis (C) patients, all 1:400 diluted in PBS 1 \times plus 0.05% Tween 20. Bound antibodies were detected with a peroxidase-conjugated goat anti-human IgG secondary antibody (1:10 000 diluted). The x-axis represents the isoelectric point (pI), and the y-axis represents the molecular weight (kDa) indicated by a commercial marker (BenchMark™ protein ladder). The identified spots after their recognition by antibodies in sera of VL patients are marked in the 2DE stained gel (D), and their identities are given in Table 1. Immunoblots are a reliable representation of three independent experiments.

Serological follow-up after VL treatment

To evaluate the serological reactivity of rGTP and rENDO proteins using sera samples from treated and untreated VL patients, samples from patients ($n=10$, including six males and four females, with ages ranging from 32 to 57 years) were collected before and six months after treatment using pentavalent antimonials (Sanofi Aventis Farmacéutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brazil). All patients were submitted to the same therapeutic regimen using the pharmaceuticals, at a dose of 20 mg Sb⁵⁺ per kg during 30 days, and none of them suffered from any other infections or had any pre-existing disease. When all of them had the treatment completed, they were free of any symptom of disease.

Statistical analysis

The results were entered into Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and analysed using GraphPad Prism™ (version 6.0 for Windows). Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to obtain the sensitivity (Se), specificity (Sp), area under the curve (AUC) and likelihood ratio (LR); as well as the lower limit of positivity (cut-off). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed

by the Bonferroni's post-test for multiple comparisons between the groups. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Identifying the immunoreactive spots in the *L. infantum* promastigotes and amastigotes

In our study, *L. infantum* promastigote protein extracts were reacted with antibodies in sera from VL patients in an immunoproteomics approach. Samples from Chagas disease patients and healthy controls were used to exclude the most cross-reactive spots. Results showed a low reactivity when sera from healthy individuals were used (Fig. 1A). On the other hand, higher reactivity was found when sera from Chagas disease patients were employed in the analysis (Fig. 1B). The majority of the identified spots showed pH between 4.0 and 5.5, and molecular weight varying from 20 to 70 kDa. When sera from VL patients were used, about 200 protein spots were visualized (Fig. 1C). From the selected spots in *L. infantum* promastigotes (Fig. 1D), a sequencing reaction was performed and 29 valid sequences were identified in this parasite stage. Table 1 shows the identity of

Table 1. Proteins of *L. infantum* promastigotes recognized by antibodies in visceral leishmaniasis patients in an immunoproteomic approach

Spot number ^a	Accession number ^b	Protein name ^c	pI ^d	M _r ^e
1/4/12/37	LINF_300039600	CAS/CSE/importin domain protein	5.43	108.017
3	LINF_090005600	Endonuclease III	9.86	29.288
5	LINF_290024300	Paraflagellar rod protein 1C	5.06	69.058
6	LINF_290024200	Paraflagellar rod protein 1D	5.10	68.575
13/14	LINF_320030800	Hypothetical protein	6.29	232.483
17	LINF_350027200	RNA-binding protein	8.41	30.257
18	LINF_350012100	Proteasome activator protein	5.15	23.958
19/21	LINF_230005400	Peroxidoxin	6.92	25.369
20	LINF_260024900	Hypothetical protein	4.73	89.019
25/26/72	LINF_080017700	Beta-tubulin	4.45	49.799
28/27	LINF_300018100	Pyridoxal kinase	6.37	33.128
29	LINF_340014000	Elongation factor 1-beta	4.90	25.935
30/44/47/62/67	LINF_130008400	Alpha-tubulin	4.65	49.758
32/33/35/36	LINF_330009500	Heat shock protein 83	4.79	80.549
34	LINF_130009400	ALBA-domain protein 1	4.80	13.405
38	LINF_250020400	GTP-binding protein	6.51	24.223
39/48/54/55/63	LINF_300018100	Pyridoxal kinase	6.37	33.128
42	LINF_290013500	Hypothetical protein	5.27	51.677
45	LINF_330033600	Hypothetical protein	8.23	56.498
46	LINF_120011900	Cytochrome oxidase subunit IV	5.51	39.596
49	LINF_340025300	IQ calmodulin-binding motif containing protein	10.3	128.596
50/51	LINF_360006800	Elongation factor 2	5.95	94.146
53	LINF_140018200	Poly(A) polymerase	7.47	77.146
57	LINF_120016600	Hypothetical protein	6.92	95.508
58	LINF_140014400	Calpain-like cysteine peptidase	4.40	12.931
59	LINF_340014000	Elongation factor 1-beta	4.90	25.935
61	LINF_120006200	Hypothetical protein	5.72	91.580
65//68/74	LINF_280035000	Heat-shock protein 70	5.15	71.267
70/74	LINF_290009600	Hypothetical protein	6.68	78.448

^aSpot number in the bidimensional gel.^bAccession numbers according to NCBI.^cName of the identified protein.^dPredicted isoelectric point (pI).^ePredicted molecular weight (M_r, in kDa).

the identified proteins, also describing their accession number, molecular weight and isoelectric point.

In this same manner, using the *L. infantum* amastigotes, sera of healthy subjects showed a low reactivity (Fig. 2A), while higher number of spots were recognized by using Chagas disease patients sera were used in the blots (Fig. 2B), with the majority of spots concentrated between 50 and 120 kDa and with pH varying from 4.5 to 5.5. Similarly to found in the promastigote extract, higher number of spots was visualized when VL patients sera were employed in the immunoblottings (Fig. 2C), when over 150 spots were visualized. From the selected spots in *L. infantum* amastigotes (Fig. 2D), a sequencing reaction was performed and 21 valid sequences were identified in this parasite stage. Table 2 shows the identity of the identified proteins in the amastigote extract, describing their accession number, molecular weight and isoelectric point.

Evaluating the biological functions of identified proteins

Among the proteins recognized by antibodies in VL patients sera in the promastigote extract, seven hypothetical and 22 known antigens were identified. Proteins related to the parasite virulence, such as alpha- and beta-tubulins (Coulson *et al.*, 1996; Coelho *et al.*, 2012) and heat-shock protein 70 (Drini *et al.*, 2016); therapeutic targets, such as RNA-binding protein (Nandan *et al.*, 2017), endonuclease III (Moreira *et al.*, 2017), GTP-binding protein (Ishemgulova *et al.*, 2017) and pyridoxal kinase (Kumar *et al.*, 2018); and vaccine candidates, such as paraflagellar rod protein (Carrillo *et al.*, 2008), peroxidoxin (Bayih *et al.*, 2014) and elongation factor (Sabur *et al.*, 2018) were found. In the amastigote extract, four hypothetical and 17 known proteins were identified. From these, virulence factors, such as leucine-rich repeat protein (Mukherjee *et al.*, 2016), diagnosis markers, such as enolase (Duarte *et al.*, 2017), vaccine candidates, such as eukaryotic initiation factor 4a (Maspi *et al.*, 2015), and

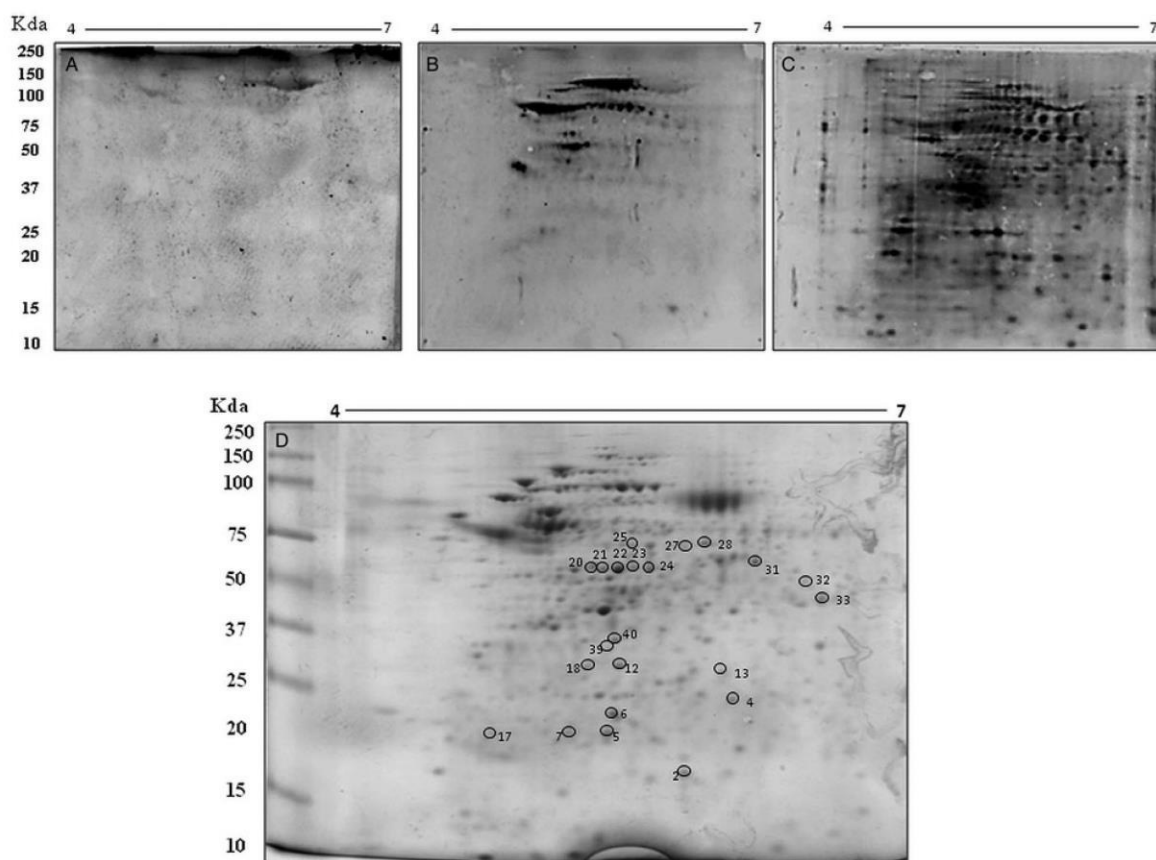


Fig. 2. Two-dimensional profile and immunoproteomic analysis in *L. infantum* amastigote protein extracts. Bidimensional gels were obtained after separation of axenic amastigote protein extracts of the parasites (150 μ g) by using in the first dimension: IEF pH range 4–7, and second dimension: 12% SDS-PAGE. After, they were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250. Immunoblots were developed after incubation of membranes with sera pools from healthy subjects (A), Chagas disease (B) or visceral leishmaniasis (C) patients, all 1:400 diluted in PBS 1 \times plus 0.05% Tween 20. Bound antibodies were detected with a peroxidase-conjugated goat anti-human IgG secondary antibody (1:10 000 diluted). The x-axis represents the isoelectric point (pI), and the y-axis represents the molecular weight (kDa) indicated by a commercial marker (BenchMark™ protein ladder). The identified spots after their recognition by antibodies in sera of VL patients are marked in the 2DE stained gel (D), and their identities are given in Table 2. Immunoblots are a reliable representation of three independent experiments.

drug targets, such as calpain-like cysteine peptidase (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2017) were recognized.

as an antigen, similar antibody levels were found before and after treatment.

Testing two recombinant proteins as diagnostic markers for VL

Two proteins that were identified in the promastigote extract, endonuclease III and GTP-binding, were cloned, expressed, purified and their recombinant versions (rENDO and rGTP, respectively) were evaluated in ELISA experiments. The individual OD values obtained against the different antigens are shown (Fig. 3), and ROC curves were constructed to obtain the cut-off values. Results showed that both proteins presented sensitivity and specificity values of 100 and 99.31%, respectively, with AUC of 1.0 and a likelihood ratio of 145; while using *L. infantum* SLA as a control antigen, sensitivity and specificity values were of 63.31 and 26.67%, respectively, with AUC of 0.67 and likelihood ratio of 38.67 (Table 3).

IgG antibody levels before and after the VL treatment

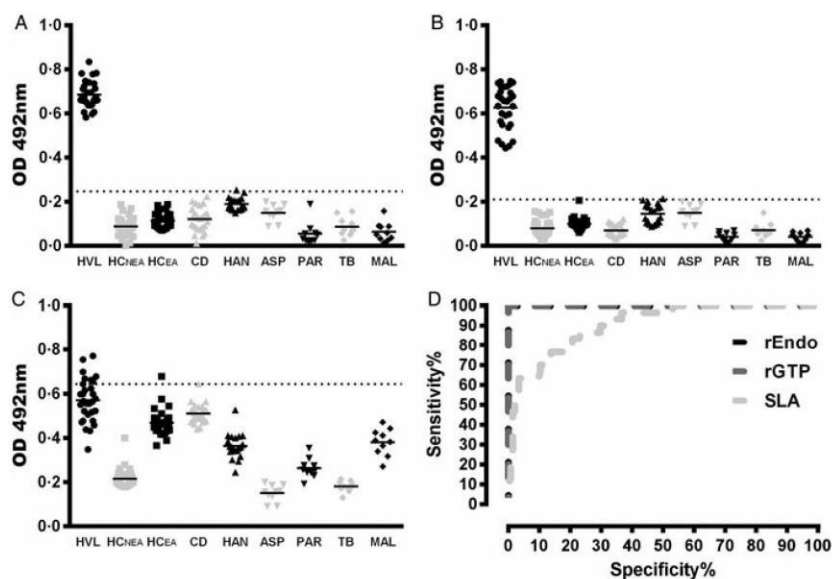
With the purpose to evaluate the serological reactivity of the patients before and after treatment, sera were collected and ELISA assays were performed. Results showed a significant decrease in the protein-specific IgG antibody levels, 6 months after the treatment of the patients (Fig. 4). Otherwise, using *L. infantum* SLA

Discussion

Visceral leishmaniasis is a neglected disease in which the outcome of infection can be fatal if acute and left untreated (Burza *et al.*, 2018). Diagnostic tests are still related to invasive aspiration or by means of immunochromatographic evaluations. Advancements in immunoproteomics employing bidimensional electrophoresis and mass spectrometry have enabled the identification of new markers for disease diagnosis and prognosis, as well as to their use in therapeutic monitoring and the understanding of the infected hosts' immune response (Kumari *et al.*, 2008; Ejazi *et al.*, 2018). In this study, an immunoproteomics approach was performed using VL patients sera, as well as from Chagas disease patients and healthy endemic control; those employed to exclude the most cross-reactive spots. From this approach, 29 and 21 valid sequences were identified by MALDI-TOF/TOF and mass spectrometry in the promastigote and amastigote stages of the parasites. On the basis of results obtained, these antigens can be expected to be antigenic in the human VL. Some of them, such as tubulins and heat shock proteins are housekeeping in *Leishmania* (Coelho *et al.*, 2012); while others, such as paraflagellar rod protein, elongation factor and enolase present immunological role in the disease in mammalian hosts

Table 2. Proteins of *L. infantum* amastigotes recognized by antibodies in visceral leishmaniasis patients in an immunoproteomic approach

Spot number ^a	Access number ^b	Protein name ^c	pI ^d	M _r ^e
2	LINF_270014400	Right-handed beta helix region/periplasmic copper-binding protein	6.81	347.161
4	LINF_350012100	Proteasome activator protein pa26	5.15	23.959
5	LINF_230005400	Peroxidoxin	6.43	25.370
6	LINF_250012900	Eukaryotic translation initiation 5A	4.62	17.826
7	LINF_320037600	Leucine-rich repeat protein	4.54	96.15
12	LINF_300039600	Putative CAS/CSE/importin domain protein	5.43	108.017
13	LINF_320008900	Hypothetical protein	9.22	57.423
17/18	LINF_280039500	Glucosamine 6-phosphate n-acetyltransferase	7.41	16.32
20	LINF_280028700	Mannosyl oligosaccharide glucosidase	8.14	107.533
21	LINF_310018300	Cytochrome b5-like haem/steroid binding domain containing protein	4.37	17.225
22	LINF_010008300	Hypothetical protein	9.85	23.543
23	LINF_300018100	Pyridoxal kinase	6.37	33.128
24	LINF_350044500	PFPI/DJ-1-like protein	10.01	16.768
25	LINF_140018000	Enolase	5.12	46.36
27	LINF_270011100	Calpain-like cysteine peptidase	5.09	507.736
28	LINF_210019600	Hypothetical protein	8.20	116.161
31	LINF_010012800	Eukaryotic initiation factor 4a	6.15	45.326
32	LINF_320041000	B-box zinc finger containing protein	9.27	142.361
33	LINF_300018100	Pyridoxal kinase	6.37	33.128
39	LINF_120006200	Hypothetical protein	5.72	91.58
40	LINF_340014000	Elongation factor 1-beta	4.90	25.935

^aSpot number in the bidimensional gel.^bAccession numbers according to NCBI.^cName of the identified protein.^dPredicted isoelectric point (pI).^ePredicted molecular weight (M_r, in kDa).**Fig. 3.** Evaluation of recombinant antigens for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. ELISA experiments were performed using the rEndo and rGTP proteins and *L. infantum* SLA, as a control. Sera samples from visceral leishmaniasis (HVL, $n=30$) patients and healthy individuals living in non-endemic (HCNEA, $n=30$) or endemic (HCEA, $n=30$) areas of leishmaniasis were used. To evaluate the cross-reactivity of the antigens, samples from Chagas disease (CD, $n=25$), leprosy (HAN, $n=20$), aspergillosis (ASP, $n=10$), paracoccidioidomycosis (PAR, $n=10$), tuberculosis (TB, $n=10$) and malaria (MAL, $n=10$) patients were used in the assays. The cut-off values were calculated by Receiver Operator Curves (ROC). Results showing the optical density (OD) values of each sample, as well as the mean of sera groups for the rEndo (A), rGTP (B) and SLA (C) antigens, are shown. ROC curves were used to determine ELISA sensitivity (95% CI), specificity (95% CI) and AUC for the diagnostic antigens (D).

(Carrillo *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2017; Sabur *et al.*, 2018). Not less important, a number of hypothetical proteins were identified by antibodies in VL patients sera, when both proteins extracts were tested; thus demonstrating the possibility to also evaluate these antigens as diagnostic markers and/or vaccine candidates against

disease (Lage *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2018; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2019).

In our study, we have chosen two parasite proteins that were recognized in the promastigote extract, aiming to validate our data generated in the immunoproteomics approach, by using

Table 3. Diagnostic performance of the antigens for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis

Antigen	AUC	P value	Cut-off	Se	95% CI	Sp	95% CI	LR+
rENDO	1	<0.0001	>0.2473	100	88.43–100	99.31	96.22–99.98	145
rGTP	1	<0.0001	>0.2105	100	88.43–100	99.31	96.22–99.98	145
<i>L. infantum</i> SLA	0.67	<0.05	>0.6438	63.31	46.22–79.98	26.67	12.28–45.89	38.67

A human serological panel was used in ELISA experiments against rENDO, rGTP and *L. infantum* SLA. Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to obtain the sensitivity (Se), specificity (Sp), area under the curve (AUC) and likelihood ratio (LR) values; as well as the lower limit of positivity (cut-off).

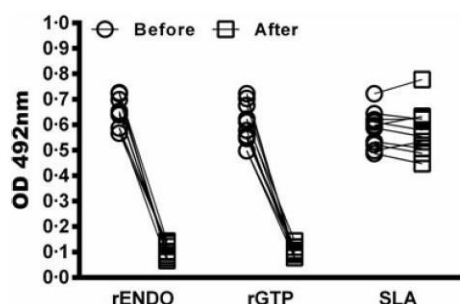


Fig. 4. Serological reactivity of the recombinant proteins before and after treatment of visceral leishmaniasis patients. Sera samples were collected before and six months after treatment of VL ($n = 10$), and the anti-protein and anti-parasite IgG levels were investigated. White circles and square shown the optical density (OD) values of the individual samples collected before and after treatment, respectively.

ELISA experiments and a large serological panel. Results showed that the recombinant proteins, rENDO and rGTP, showed high sensitivity and specificity values to identify VL samples. Additionally, they were not recognized by antibodies in sera from patients with paracoccidioidomycosis, leprosy, aspergillosis, tuberculosis or malaria; as well as by sera from non-endemic or endemic healthy controls. This fact opens the possibility to test these candidates in future studies for the serodiagnosis of human disease.

GTP-binding proteins are considered as virulence factors in *Leishmania*, being involved in the drug resistance against *L. amazonensis* species (Lang et al., 1994; Ishemgulova et al., 2017). These molecules participate in secretion pathways and/or environmental response of parasites, as well as in the communication with the host cell during the infection (Ishemgulova et al., 2017). Recently, Magalhães et al. (2014) applied a proteomic approach in *L. amazonensis* to analyse the variation of the protein expression profile, when parasites were *in vitro* cultured for a 150-day period. Results showed that 37 proteins presented a significant decrease in their expression content, whereas 19 proteins showed a significant increase in their content during the cultivation. The authors associated some of these proteins as diagnosis markers, vaccine candidates and/or drug targets on leishmaniasis. One of them, the GTP-binding protein, was showed to decrease its expression content in the order of 3.13-fold during the cultivation. It and others that also decrease their expression were considered as parasites' infectivity factors, in which a significant reduction in their *in vitro* and *in vivo* infectivity was found after 150 days of cultivation (Magalhães et al., 2014).

Recent evidence has shown that the characteristics of the *Leishmania* replication and repair machinery can be used as targets for the development of new therapeutic strategies. In this context, the evaluation of DNA repair enzymes as biological targets can open the way to the identification of potential targets for the development of novel diagnostic and therapeutic strategies (Rajão et al., 2014). One of the proteins identified here,

endonuclease III, is a DNA repair glycosylase, previously known for its repair activity on oxidative pyrimidine damage (Mishra et al., 2018). In this study, the diagnostic potential of this enzyme was successfully evaluated, then speculate about the possible employment of this recombinant antigen for the serodiagnosis of disease.

Different strategies have been tested to provide understanding about the hosts' immune response against infection by different pathogens, such as *Leishmania*, such as by proteomic studies (Chambers et al., 2000; Sundar and Singh, 2018). Previous work published used the immunoproteomics tool to identify antigenic proteins in *L. braziliensis* protein extracts by antibodies in sera from tegumentary leishmaniasis (TL) patients. With the purpose to reduce the cross-reactivity of the identified proteins, spots highly recognized by antibodies in sera from Chagas disease patients and healthy individuals living in an endemic region were excluded. Results showed that 20 proteins were identified in the protein extracts, and five of them were cloned, expressed, purified and tested in ELISA experiments for the diagnosis of TL, with serological results showing high sensitivity and specificity values (Duarte et al., 2015).

Here, the experimental strategy was also based on the exclusion of the most reactive spots, since sera samples from Chagas disease patients and healthy controls were used. This fact is based on the high cross-reactivity found when serodiagnosis tests are applied in such patients, and could justify the low number of identified proteins. In addition, several antigens recognized by antibodies in parasite extracts were recognized as multiple spots or proteolytic fragments. Although their degradation cannot be discarded; extracts were prepared in the presence of a cocktail of protease inhibitors. As a consequence, these findings can be associated with the presence of isoforms or post-translational modifications, known to occur in *Leishmania* parasites (Brotherton et al., 2010; Coelho et al., 2012; Moreira et al., 2015).

The serological evaluation in cured patients should also be considered, since the purpose of diagnostic tools is to develop a test that can be used in endemic regions to detect active disease. Results obtained in this study can be considered promising, since lower serological reactivity specific to rGTP and rENDO proteins was found in the cured and treated VL patients. Conversely, rA2 and SLA did not show such discriminative results, and new experiments must be performed to confirm the lack of their diagnostic role in human disease. To the best of our knowledge, the present study is the first in which these proteins were effective to discriminate patients after treatment had been completed; thus suggesting the possibility of using them as serological markers for VL, as well as to correlate the presence of low levels of specific antibodies with the clinic cure of patients. As limiting factor of the work, the small number of patients evaluated before and after treatment should be considered and certainly new studies are necessary to be performed.

Taking into account, results indicated patterns of protein recognition by antibodies in sera from *L. infantum*-infected patients by an immunoproteomics approach, and suggested that rENDO and rGTP could be evaluated as diagnostic markers for human VL, as well as in the monitoring of human disease treatment. Additional

studies using these antigens, as well as others identified in the amastigote forms, should be performed to validate our findings about the use of these proteins as diagnostic markers for human VL.

Author ORCIDs.  Eduardo A. F. Coelho, 0000-0002-6681-9014.

Financial support. The authors would like thank CAPES, CNPq and FAPEMIG for scholarships. This work was supported by grants from CNPq (APQ-408408/2016-2 and APQ-408675/2018-7).

Conflict of interest. None.

Ethical standards. The study was approved by the Human Research Ethics Committee from Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil (protocol number CAAE-32343114.9.0000.5149).

References

- Alves F, Bilbe G, Blesson S, Goyal V, Monnerat S, Mowbray C, Muthoni GO, Pécoul B, Rijal S, Rode J, Solomos A, Strub-Wourgaft N, Wasunna M, Wells S, Zijlstra EE, Arana B and Alvar J (2018) Recent development of visceral leishmaniasis treatments: successes, pitfalls, and perspectives. *Clinical Microbiology Reviews* **31**, e00048.
- Bayih AG, Daifalla NS and Gedamu L (2014) DNA-protein immunization using *Leishmania* peroxidoxin-1 induces a strong CD4+ T cell response and partially protects mice from cutaneous leishmaniasis: role of fusion murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor DNA adjuvant. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**, e3391.
- Brotherton MC, Racine G, Foucher AL, Drummel-Smith J, Papadopoulou B and Ouellette M (2010) Analysis of stage-specific expression of basic proteins in *Leishmania infantum*. *Journal of Proteome Research* **9**, 3842–3853.
- Burza S, Croft SL and Boelaert M (2018) Leishmaniasis. *Lancet* **392**, 951–970.
- Carrillo E, Crusat M, Nieto J, Chicharro C, Thomas MC, Martínez E, Valladares B, Cañavate C, Requena JM, López MC, Alvar J and Moreno J (2008) Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* **26**, 1902–1911.
- Chambers G, Lawrie L, Cash P and Murray GI (2000) Proteomics: a new approach to the study of disease. *The Journal of Pathology* **192**, 280–288.
- Chávez-Fumagalli MA, Schneider MS, Lage DP, Machado-de-Ávila RA and Coelho EA (2017) An *in silico* functional annotation and screening of potential drug targets derived from *Leishmania* spp. hypothetical proteins identified by immunoproteomics. *Experimental Parasitology* **176**, 66–74.
- Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Tavares GSV, Mendonça DVC, Dias DS, Ribeiro PAF, Ludolf F, Costa LE, Coelho VTS and Coelho EAF (2019) *In silico* *Leishmania* proteome mining applied to identify drug target potential to be used to treat against visceral and tegumentary leishmaniasis. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **87**, 89–97.
- Coelho EA, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlashewski G, Gazzinelli RT and 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. *Infection and Immunity* **71**, 3988–3994.
- Coelho VT, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, Soto M, Santoro MM, Tavares CA, Fernandes AP and Coelho EA (2012) Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1430.
- Coulson RM, Connor V, Chen JC and Ajioka JW (1996) Differential expression of *Leishmania major* beta-tubulin genes during the acquisition of promastigote infectivity. *Molecular and Biochemical Parasitology* **82**, 227–236.
- Dias DS, Martins VT, Ribeiro PAF, Ramos FF, Lage DP, Tavares GSV, Mendonça DVC, Chávez-Fumagalli MA, Oliveira JS, Silva ES, Gomes DA, Rodrigues MA, Duarte MC, Galdino AS, Menezes-Souza D and Coelho EAF (2018) Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of a conserved *Leishmania* hypothetical protein against visceral leishmaniasis. *Parasitology* **145**, 740–751.
- Didwania N, Shadab M, Sabur A and Ali N (2017) Alternative to chemotherapy—the unmet demand against leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* **8**, 1779.
- Drini S, Criscuolo A, Lechat P, Imamura H, Skalický T, Rachidi N, Lukeš J, Dujardin JC and Späth GF (2016) Species- and strain-specific adaptation of the HSP70 super family in pathogenic Trypanosomatids. *Genome Biology and Evolution* **8**, 1980–1995.
- Duarte MC, Pimenta DC, Menezes-Souza D, Magalhães RD, Diniz JL, Costa LE, Chávez-Fumagalli MA, Lage PS, Bartholomeu DC, Alves MJ, Fernandes AP, Soto M, Tavares CA, Gonçalves DU, Rocha MO and Coelho EA (2015) Proteins selected in *Leishmania* (*viannia*) *braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology* **22**, 1187–1196.
- Duarte MC, Lage DP, Martins VT, Costa LE, Salles BCS, Carvalho AMRS, Oliveira TTS, Dias DS, Ribeiro PAF, Chávez-Fumagalli MA, Machado-de-Ávila RA, Roatt BM, Menezes-Souza D, Magalhães-Soares DF and Coelho EAF (2017) Performance of *Leishmania braziliensis* enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* **238**, 77–81.
- Ejazi SA, Bhattacharyya A, Choudhury ST, Ghosh S, Sabur A, Pandey K, Das VNR, Das P, Rahaman M, Goswami RP and Ali N (2018) Immunoproteomic identification and characterization of *Leishmania* membrane proteins as non-invasive diagnostic candidates for clinical visceral leishmaniasis. *Scientific Reports* **8**, 12110.
- Fernandes AP, Coelho EAF, Machado-Coelho GLL, Grimaldi J and Gazzinelli RT (2012) Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Current Opinion in Microbiology* **15**, 1–10.
- Garg G, Singh K and Ali V (2018) Proteomic approaches unravel the intricacy of secreted proteins of *Leishmania*: an updated review. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics* **1866**, 913–923.
- Georgiadou SP, Makaritsis KP and Dalekos GN (2015) Leishmaniasis revisited: current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Translational Internal Medicine* **3**, 43–50.
- Grimaldi Jr G, Teva A, Porrozzini R, Pinto MA, Marchevsky RS, Rocha MG, Dutra MS, Bruña-Romero O, Fernandes AP and Gazzinelli RT (2014) Clinical and parasitological protection in a *Leishmania infantum*-macaque model vaccinated with adenovirus and the recombinant A2 antigen. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**, e2853.
- Ishemgulova A, Kraeva N, Hlaváčová J, Zimmer SL, Butenko A, Poděšvová L, Leštinová T, Lukeš J, Kostygov A, Votýpka J, Volf P and Yurchenko V (2017) A putative ATP/GTP binding protein affects *Leishmania mexicana* growth in insect vectors and vertebrate hosts. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **11**, e0005782.
- Jamal F, Shivam P, Kumari S, Singh MK, Sardar AH, Pushpanjali MS, Narayan S, Gupta AK, Pandey K, Das VNR, Ali V, Bimal S, Das P and Singh SK (2017) Identification of *Leishmania donovani* antigen in circulating immune complexes of visceral leishmaniasis subjects for diagnosis. *PLoS One* **12**, e0182474.
- Kapil S, Singh PK and Silakari O (2018) An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. *European Journal of Medicinal Chemistry* **157**, 339–367.
- Kumar A and Samant M (2016) DNA vaccine against visceral leishmaniasis: a promising approach for prevention and control. *Parasite Immunology* **38**, 273–281.
- Kumar V, Sharma M, Rakesh BR, Malik CK, Neelagiri S, Neerupudi KB, Garg P and Singh S (2018) Pyridoxal kinase: a vitamin B6 salvage pathway enzyme from *Leishmania donovani*. *International Journal of Biological Macromolecules* **119**, 320–334.
- Kumari S, Kumar A, Samant M, Sundar S, Singh N and Dube A (2008) Proteomic approaches for discovery of new targets for vaccine and therapeutics against visceral leishmaniasis. *Proteomics – Clinical Applications* **2**, 372–386.
- 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 and 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. *Parasitology Research* **115**, 1649–1658.
- Lang T, Chastellier C, Frehel C, Hellio R, Metzzeau P, Leão SS and Antoine JC (1994) Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *Journal of Cell Science* **107**, 69–82.

- Lewis TS, Hunt JB, Aveline LD, Jonscher KR, Louie DF, Yeh JM, Nahreini TS, Resing KA and Ahn NG (2000) Identification of novel MAP kinase pathway signalling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Molecular Cell* **6**, 1343–1354.
- Lima MP, Costa LE, Duarte MC, Menezes-Souza D, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Chávez-Fumagalli MA, Kursancew ACS, Ambrósio RP, Roatt BM, Machado-de-Ávila RA, Gonçalves DU and Coelho EAF (2017) Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitology Research* **116**, 1197–1206.
- Magalhães RD, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Menezes-Souza D, Régis WC, Alves MJ, Soto M, Tavares CA, Nagen RA and Coelho EA (2014) Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**, e2764.
- Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Canavacci AM, Martins AM, Lage PS, Lage DP, Duarte MC, Valadares DG, Magalhães RD, Ribeiro TG, Nagem RA, DaRocha WD, Régis WC, Soto M, Coelho EA, Fernandes AP and Tavares CA (2013) Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**, e2148.
- Maspi N, Ghaffarifar F, Sharifi Z and Dalimi A (2015) Cloning and constructing a plasmid encoding *Leishmania* eukaryotic initiation factor gene of *Leishmania major* fused with green fluorescent protein gene as a vaccine candidate. *West Indian Medical Journal* **65**, 256–259.
- Mishra A, Khan MI, Jha PK, Kumar A, Das S, Das P and Sinha KK (2018) Oxidative stress-mediated overexpression of uracil DNA glycosylase in *Leishmania donovani* confers tolerance against antileishmanial drugs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**, 4074357.
- Moreira DS, Pescher P, Laurent C, Lenormand P, Späth GF and Murta SM (2015) Phosphoproteomic analysis of wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* lines by 2D-DIGE technology. *Proteomics* **15**, 2999–3019.
- Moreira VR, Jesus LCL, Soares RP, Silva LDM, Pinto BAS, Melo MN, Paes AMA and Pereira SRF (2017) Meglumine antimoniate (glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**, e02360.
- Mortazavidehkordi N, Farjadfar A, Khanahmad H, Najafabadi ZG, Hashemi N, Fallah A, Najafi A, Kia V and Hejazi SH (2016) Evaluation of a novel lentiviral vaccine expressing KMP11-HASPB fusion protein against *Leishmania infantum* in BALB/c mice. *Parasite Immunology* **38**, 670–677.
- Mukherjee I, Chakraborty A and Chakrabarti S (2016) Identification of internalin-A-like virulent proteins in *Leishmania donovani*. *Parasite & Vectors* **9**, 557.
- Nandan D, Thomas SA, Nguyen A, Moon KM, Foster LJ and Reiner NE (2017) Comprehensive identification of mRNA-binding proteins of *Leishmania donovani* by interactome capture. *PLoS One* **12**, e0170068.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D and Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255–262.
- Nico D, Claser C, Borja-Cabrera GP, Travassos LR, Palatnik M, Soares IS, Rodrigues MM and Palatnik-de-Sousa CB (2010) Adaptive immunity against *Leishmania* nucleoside hydrolase maps its c-terminal domain as the target of the CD4⁺ T cell-driven protective response. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**, e866.
- Rajão MA, Furtado C, Alves CL, Passos-Silva DG, Moura MB, Schamber-Reis BL, Kunrath-Lima M, Zuma AA, Vieira-da-Rocha JP, Garcia JB, Mendes IC, Pena SD, Macedo AM, Franco GR, Souza-Pinto NC, Medeiros MH, Cruz AK, Motta MC, Teixeira SM and Machado CR (2014) Unveiling Benzimidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **55**, 309–321.
- Ribeiro PAF, Dias DS, Novais MVM, Lage DP, Tavares GSV, Mendonça DVC, Oliveira JS, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Duarte MC, Menezes-Souza D, Ludolf F, Tavares CAP, Oliveira MC and Coelho EAF (2018) A *Leishmania* hypothetical protein-containing liposome-based formulation is highly immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. *Cytokine* **111**, 131–139.
- Sabur A, Bhowmick S, Chhajer R, Ejazi SA, Didwania N, Asad M, Bhattacharyya A, Sinha U and Ali N (2018) Liposomal elongation factor-1 α triggers effector CD4 and CD8 T cells for induction of long-lasting protective immunity against visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* **9**, 18.
- Sakkas H, Gartzonika C and Levidiotou S (2016) Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Journal of Vectors Borne Diseases* **53**, 8–16.
- Santos TTO, Martins VT, Lage DP, Costa LE, Salles BCS, Carvalho AMRS, Dias DS, Ribeiro PAF, Chávez-Fumagalli MA, Machado-de-Ávila RA, Roatt BM, Magalhães-Soares DF, Menezes-Souza D, Coelho EAF and Duarte MC (2017) Probing the efficacy of a heterologous *Leishmania* *Viannia braziliensis* recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of *L. infantum* in BALB/c mice. *Acta Tropica* **171**, 8–16.
- Sundar S and Singh OP (2018) Molecular diagnosis of visceral leishmaniasis. *Molecular Diagnosis & Therapy* **22**, 443–457.
- Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J and Arenas R (2017) Leishmaniasis: a review. *F1000Research* **6**, 750.
- Valadares DG, Duarte MC, Oliveira JS, Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Costa LE, Leite JP, Santoro MM, Régis WC, Tavares CA and Coelho EA (2011) Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei murill* in different *Leishmania* species. *Parasitology International* **60**, 357–363.
- Vijayakumar S and Das P (2018) Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. *Acta Tropica* **181**, 95–104.
- Vlahou A and Fountoulakis M (2005) Proteomic approaches in the search for disease biomarkers. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **814**, 11–19.
- World Health Organization (2016) Leishmaniasis. Available at <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos neste projeto, podemos concluir que a análise imunoproteômica realizada nos extratos proteicos de formas promastigotas estacionárias e amastigotas-like de *Leishmania infantum* permitiu a identificação de 29 e 21 proteínas em tais estágios dos parasitos, respectivamente. Dois antígenos foram selecionados e avaliados em experimentos de ELISA, onde demonstraram elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LVH. Os antígenos exibiram ainda um diferencial ao apresentarem menor reatividade sorológica em pacientes curados e tratados com LV, criando a possibilidade da utilização dos mesmos sob a forma de prognóstico da doença.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar os antígenos rENDO e rGTP em outras plataformas diagnósticas, tais como tiras imunocromatográficas e avaliar sua efetividade no sorodiagnóstico da LVH.
- Avaliar outras proteínas identificadas no trabalho e preparar genes quiméricos responsáveis pela codificação de epitopos específicos de células B para utilização no diagnóstico da doença.

8. REFERÊNCIAS

ABASS, E.; KANG, C.; MARTINKOVIC, F.; SEMIÃO-SANTOS, S. J.; SUNDAR, S.; WALDEN, P.; PIARROUX, R.; HARITH A., LOHOFF, M.; STEINHOFF, U. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. *PloS one*, v. 10(3), p. 1-13, 2015.

ALLAHVERDIYEV, A. M.; BAGIROVA, M.; UZUN, S.; ALABAZ, D.; AKSARAY, N.; KOCABAS, E.; KOKSAL, F. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 73, n. 2, p. 276-280, 2005.

ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Advances in parasitology*, v. 61, p. 223-274, 2006.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. D.; THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*. v. 7, n. 5, p. e35671. 2012.

ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; PIOLINI, R.; MAGNI, C.; ORLANDO, G.; GRAMICCIA, M.; ACQUAVIVA, V.; FOSCHI, A.; STEFANO CORVASCE, S.; COLOMBA, C.; TITONE, L.; PARRAVICINI, C.; CASCIO, A.; CORBELLINO, M. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clin Infect Dis*, v. 44, p. 1602–10, 2007.

ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M.A.; KHURSHID, M.; RASOOL, M. H. *Proteomics: Technologies and Their Applications*. n. 5, p. 1–15, 2016.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D.JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. v. 154, n. 6, p. 1003-11. 1986.

BADARO, R.; BENSON, D.; EULALIO, M.C.; FREIRE, M.; CINHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D. MADUREIRA, C.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, S.G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *Journal of infectious diseases*, v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. v. 24, n. 7, p. 324–330. 2008.

BI, K.; CHEN, Y.; ZHAO, S.; KUANG, Y.; JOHN W.; CHIH H. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. *BioMed Research International*, v. 2018, 2018.

BOELAERT, M.; RIJAL, S.; REGMI, S.; SINGH, R.; KARKI, B.; JACQUET, D.; CHAPPUIS, F.; CAMPINO, L.; DESJEUX P.; LE RAY, D.; KOIRALA, S.; VAN DER STUYFT, P. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 70(1), p. 72–7, 2004.

BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E.T.; MARTINS, D.R.A.; WILSON, M.E.; PEARSON, R.D.; REED, S.G.; JERONIMO, S.M.B. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 67, n. 4, p. 344–348, 2002.

BROTHERTON, M.C.; BOURASSA, S.; LEGARE, D.; POIRIER, G.G.; DROIT, A.; OUELLETTE, M. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 2, p. 126–132, 2014.

BURNS, J.M. JR.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H.W.; BADARO, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 2, p. 775–779, 1993.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CHAPPUIS, F. SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

COELHO, V. T. S.; OLIVEIRA, J S.; VALADARES, D. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; DUARTE, M. C.; LAGE, P. S.; SOTO, M.; SANTORO, M. M.; TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A. P.; COELHO, E.A.F. 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.

DAVIES, C.R.; KAYE, P.; CROFT, S.L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ*. v. 326, p. 377–82, 2003.

DE RUITER, C.M.; VAN DER VEER, C.; LEEFLANG, M.M.; DEBORGGRAEVE, S.; LUCAS, C.; ADAMS, E.R. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol*, v. 52(9), p. 3147–55, 2014.

DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, P. A. F.; MARTINS, V. T.; LAGE, D. P.; RAMOS, F. F.; DIAS, A. L.T.; RODRIGUES, M. R.; PORTELA, A. S. B.; COSTA, L. E.; CALIGIORNE, R. B.; STEINER, B. T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; SALLES, B. C.S.; SANTOS, T. T.O.; SILVEIRA, J. A.G.; MAGALHÃES-SOARES, D. F.; ROATT, B. M.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; DUARTE, M. C.; MENEZES-SOUZA, D.; SILVA, E. S.; GALDINO, A. S.; COELHO, E. A.F. Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. *Cellular Immunology*, v. 323, n. November 2017, p. 59–69, 2018.

DOMON, B., AEBERSOLD, R.; Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, v. 312(5771), p. 212–217, 2006.

DUARTE, M.; LAGE, P. S.; BARTHOLOMEU, D. C.; ALVES, J. M.; FERNANDES, P.; SOTO, M.; TAVARES, C. A. P; GONÇALVES, D. U.; ROCHA, M. O C; COELHO, E.A. F. Proteins selected in *Leishmania (viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Cinical and Vaccine Immunology*, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, 2015.

DUARTE, M.C.; LAGE, D.P.; MARTINS, V.T.; COSTA, L.E.; CARVALHO, A.M.R.S.; LUDOLF, F.R.; SANTOS, T.T.O.; VALE, D.L.; ROATT, B. M.; MENEZES-SOUZA, D.; FERNANDES, A.P.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from *Leishmania braziliensis* cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Immunobiology*, v.51550 p.1-10, 2016.

DUARTE, M.C.; LAGE, D.P.; MARTINS, V.T.; COSTA, L.E.; SALLES, B.C.S.; CARVALHO, A.M.R.S.; SANTOS, T.T.O.; DIAS, D.S.; RIBEIRO, P.A.F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; ROATT, B. M.; MENEZES-SOUZA, D. MAGALHAES-SOARES, D. F.; COELHO, E.A.F. Performance of *Leishmania braziliensis* enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, n. October, p. 0–1, 2017.

ELMAHALLAWY, E.; MARTINEZ, A.S.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y.; AGIL, A.; MARI, J.M.N. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, v. 8(8), p. 961–72, 2014.

FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A.F.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; GRIMALDI, J.; GAZZINELLI, R.T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: Rational, update and perspectives. *Current Opinion in Microbiology*, v. 15, n. 4, p. 476–485, 2012.

GAMA, M.E.; COSTA, J.M.; GOMES, C.M.; CORBETT, C.E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 99, n. 8, p. 889-93. 2004.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Translational Internal Medicine*, v. 3, n. 2, p. 43–50, 2016.

GIDWANI, K.; PICADO, A.; OSTYN, B.; SINGH, S.P.; KUMAR, R.; KHANAL, B.; LEJON, V.; CHAPPUIS, F.; BOELAERT, M.; SUNDAR, S. Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. *Clin Vaccine Immunol*, v. 18(2), p. 346–8, 2011.

GIUNCHETTI, R. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA, R. D. A. S.; DE SOUZA, J. V.; DAS DORES MOREIRA, NÁDIA MALAQUIAS, L. C. C.; MOTA E CASTRO, L. L.; DE LANA, M.; REIS, A. B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, v. 25, n. 44, p. 7674–7686, 2007.

GRIENSVEN, J. VAN; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.

GRIENSVEN, J. VAN; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 79–99, 2019.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 6, p. 230–50. 1993.

HERWALDT BL. Leishmaniasis. *Lancet*. v. 354, p. 1191–9, 1999.

HIDE, M.; SINGH, R.; KUMAR, B.; BAÑULS, A.L.; SUNDAR, S. A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. *Acta tropica*, v. 102, n. 3, p. 197-200, 2007.

ISHEMGULOVA, A.; KRAEVA, N.; HLAVÁČOVÁ, J.; ZIMMER, S.L.; BUTENKO, A.; PODEŠVOVÁ, L.; LEŠTINOVÁ, T.; LUKEŠ, J.; KOSTYGOV, A.; VOTÝPKA, J.; VOLF, P.; YURCHENKO, V. A putative ATP/GTP binding protein affects *Leishmania mexicana* growth in insect vectors and vertebrate hosts. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, p.1-18, 2017.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical reviews in microbiology*, v. 21, p. 123-152, 1995.

LAGE, D. P.; MARTINS, V. T. DUARTE, M. C.; GARDE, E.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; TAVARES, C. A.P.; SOTO, M.; COELHO, E. A.F. Prophylactic properties of a *Leishmania*-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 37, n. 12, p. 646–656, 2015.

LAGE, D. P.; MARTINS, V. T.; DUARTE, M. C.; COSTA, L. E.; GARDE, E.; DIMER, L.M.; KURSANCEW, A. C.S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; DE MAGALHÃES-SOARES, D.F.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; SOTO, M.; TAVARES, C. A.P.; COELHO, E.A.F. 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, 2016.

LARSEN, J.E.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*, v.2, n.1, p. 2, 2006

LEWIS, T.S.; HUNT, J.B.; AVELINE, L.D.; JONSCHER, K.R.; LOUIE, D.F.; YEH, J.M.; NAHREINI, T.S.; RESING, K.A.; AHN, N.G. Identification of novel MAP kinase pathway signalling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol Cell*, v 6, p.1343–1354, 2000.

LIMA, M.P.; COSTA, L.E.; DUARTE, M.C.; MENEZES-SOUZA, D.; SALLES, B.C.S.; SANTOS, T.T.O.; RAMOS, F.F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.

KURSANCEW, A.C.S.; AMBRÓSIO, R.P.; ROATT, B.M.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; GONÇALVES, D.U.; COELHO E.A.F. Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitology Research*, v. 116, n. 4, p. 1197–1206, 2017.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; BEN SALAH, A.; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 68, n. 3, p. 312–320, 2003.

MACHADO DE ASSIS, T.S.; RABELLO, A.; WERNECK, G.L. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Tropical Medicine & International Health*, v. 17, n. 10, p. 1202–1207, 2012.

MAGALHÃES, R. D. M.; DUARTE, M. C.; MATTOS, E. C.; MARTINS, V. T.; LAGE, P. S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; LAGE, D. P.; MENEZES-SOUZA, D.; RÉGIS, W.; C.B. MANSO ALVES, M. J.; SOTO, M.; TAVARES, C. A.P.; NAGEN, R.A.P.; COELHO, E.A.F. Identification of Differentially Expressed Proteins from *Leishmania amazonensis* Associated with the Loss of Virulence of the Parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 4, 2014.

MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; COSTA, L. E.; MARTINS, A. M.C.C.; LAGE, P. S.; LAGE, D.P.; DUARTE, M.C.; VALADARES, D. G.; MAGALHÃES, R. D.M.; RIBEIRO, T. G.; NAGEM, R.A.P.; DAROCHA, W.D.; RÉGIS, W.C.B.; SOTO, M.; COELHO, E.A.F.; FERNANDES, A. P.; TAVARES, C.A.P. Antigenicity and Protective Efficacy of a *Leishmania* Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 3, 2013.

MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; LAGE, D.P.; DUARTE, M.C.; GARDE, E.; COSTA, L. E.; SILVA, V. G. D.; OLIVEIRA, J. S.; DE MAGALHÃES-SOARES, D. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; FERNANDES, A. P.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* against visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. 1–25, 2015.

MARY, C.; FARAUT, F.; DROGOUL, M.P.; XERIDAT, B.; SCHLEINITZ, N.; CUISENIER, B.; DUMON, H. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *AmJ Trop Med Hyg*, v. 75, p. 858–63, 2006.

MATRANGOLO, F.S.; LIARTE, D.B.; ANDRADE, L.C.; DE MELO, M.F.; ANDRADE, J.M.; FERREIRA, R.F.; SANTIAGO, A.S.; PIROVANI, C.P.; SILVA-PEREIRA, R.A.; MURTA, S.M. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and-susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 190, n. 2, p. 63–75, 2013.

MAURYA, R.S.; MEHROTRA, S.; PRAJAPATI, V.K.; NYLÉN, S.; SACKS DL, SUNDAR S. Evaluation of Blood agar micro-titer plates for culturing *Leishmania* parasites to titrate the parasite burden in spleen and peripheral blood of VL patients. *J Clin Microbiol*, v. 48, p. 1932–4, 2010.

MEDEIROS, I.M.; NASCIMENTO, E.L.T.; HINRICHSEN, S.L. Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). *DIP-Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasil, Brasília, DF. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasil, Brasília, DF. 1 edição, 5 reimpressão, 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf> Acesso em 20 de nov. 2020.

MISHRA, A.; KHAN, M.I.; JHA, P.K.; KUMAR, A.; DAS, S.; DAS, P.; SINHA, K.K. Oxidative stress-mediated overexpression of uracil DNA glycosylase in *Leishmania donovani* confers tolerance against antileishmanial drugs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. V. 2018, p. 1-22, 2018.

MOREIRA, V.R.; JESUS, L.C.L.; SOARES, R.P.; SILVA, L.D.M.; PINTO, B.A.S.; MELO, M.N.; PAES, A.M.A.; PEREIRA S. R.F. Meglumine antimoniate (glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 61, p. 1-17, 2017.

MURRAY, HW, BERMAN, JD, DAVIES, C.R. Advances in leishmaniasis. *Lancet* v. 366, p. 1561–77, 2005.

NEUHOFF V.; AROLD N.; TAUBE D.; EHRHARDT W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* v. 9, p. 255–262, 1988.

NICO, D.; CLASER C.; BORJA-CABRERA, G. P.; TRAVASSOS, L.R.; PALATNIK, M.; SOARES, I.S.; RODRIGUES, M. M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Adaptive immunity against *Leishmania* nucleoside hydrolase maps its C-terminal domain as the target of the CD4+ T cell-driven protective response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 11, 2010.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; DE MORAIS, R.C.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L.A.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S.C.; TAVARES, D.H.C.; BRELAZ-DE-CASTRO, M.C.; SILVA, R.F.; PEREIRA, V.R. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci* v. 2015; 5: 31, p.1-10, 2015.

PALATINIK DE SOUZA, C.B. Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. v. 3, n. 69, p. 1-15. 2012.

PEDRAS, M. J.; VIANA, L.G.; OLIVEIRA, E.J.; RABELLO, A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 2, p. 172-178, 2008.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MACHADO-DE-ASSIS, T. S.; RABELLO, A. Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 7, p. 951-952, 2012.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. *Parasitologia médica*. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1988.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of proteomics*, 74, 1829-1841, 2011.

RAJÃO, M.A.; FURTADO, C.; ALVES, C.L.; PASSOS-SILVA, D.G.; MOURA, M.B.; SCHAMBER-REIS, B.L.; KUNRATH-LIMA, M.; ZUMA, A.A.; VIEIRA-DA-ROCHA, J.P.; GARCIA, J.B.; MENDES, I.C.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M.; FRANCO, G.R.; SOUZA-PINTO, N.C.; MEDEIROS, M.H.; CRUZ, A.K.; MOTTA, M.C.; TEIXEIRA, S.M.; MACHADO, C.R.; Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. v. 55, p. 309–321, 2014.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORRÊA OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in veterinary science*, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

RYAN, J.R.; SMITHYMAN, A.M.; RAJASEKARIAH, G.H.; HOCHBERG, L.; STITELER, J.M.; MARTIN, S.K. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, v.40(3), p. 1037–43, 2002.

SACKS, D. & KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 55, p. 453-483. 2001.

SACKS, D. & SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol.* v. 3, n. 11, p. 1041-1047. 2002.

SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C. AND LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Journal of Vectors Borne Diseases*, v. 53, n.1, p. 8–16, 2016.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: Laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press. 1989.

SANTOS, T.T.O.; MARTINS, V. T.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; SALLES, B.C. S.; CARVALHO, A. M. R. S.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, P.A. F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; ROATT, BRUNO M.; MAGALHÃES-SOARES, D. F.; MENEZES-SOUZA, D.; COELHO, E.A. F.; DUARTE, M. C.V Probing the efficacy of a heterologous *Leishmania / L. Viannia braziliensis* recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of *L. infantum* in BALB / c mice. *Acta Tropica*, v. 171, p. 8–16, 2017.

SANTOS, T.T.O.; CARDOSO, M.S.; MACHADO, A.S.; SIQUEIRA, W. F.; RAMOS, F. F.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; TAVARES, G. S.V.; LAGE, D.P.; COSTA, L. E.; DE FREITAS, C. S.; MARTINS, V.T.; BANDEIRA, R. S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LYON, S.; MOREIRA, R. L.F.; DE MAGALHÃES-SOARES, D.F.; SILVEIRA, J. A.G.; TUPINAMBÁS, U.; CALIGIORNE, R. B.; CHAVES, A. T.; ROCHA, M.O.C.; FUJIWARA, RICARDO T.; COELHO, E. A.F. 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, n. October, p. 103783, 2019.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Inf Dev Ctries*. v. 9(6), p. 588–96, 2015.

SILVA, L.A.; ROMERO, H.D.; NASCENTES, G.A.N.; COSTA, R.T.; RODRIGUES, V.; PRATA, A. Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v.84(2), p. 261–6, 2011.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. v. 105, n. 1, p. 1-6. 2011.

SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. *Parasitol Res*. V. 110, p. 1065–78, 2012.

SUDARSHAN, M & SUNDAR S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 80(1), p. 40–2, 2014.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. v. 9, n. 5, p. 951-958. 2002.

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

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

The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 68, n. 3, p. 312-320, 2003.
v. 366, p. 1561–77, 2005.

VITORIANO-SOUZA, J.; MOREIRA, N. D. D.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA, R. D. A. S.; SIQUEIRA-MATHIAS, F. A.; DE OLIVEIRA, J. M. C.; GIUNCHETTI, R. C.; DE SÁ, R. G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Dogs immunized with LBSap vaccine displayed high levels of IL-12 and IL-10 cytokines and CCL4, CCL5 and CXCL8 chemokines in the dermis. *Molecular Immunology*, v. 56, n. 4, p. 540–548, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The use of visceral leishmaniasis rapid diagnostic tests. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2008. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44012/9789241597357_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 20 de nov. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>>. Acesso em: 15 de nov. 2020.


WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis, Situation and trends 2018. Disponível em: <https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 15 de nov. de 2020

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis Fact sheets, March 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>> Acesso em: 16 de nov. 2020.

9. ANEXOS

9.1 Comprovantes de aprovação do projeto pelo COEP da UFMG.

Anexo 1:



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

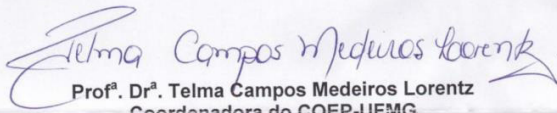
Projeto: CAAE – 32343114.9.0000.5149

Interessado(a): Prof^a. 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^a. Dr^a. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

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

Anexo 2:

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


Projeto: CAAE 67820516.8.1001.5149

**Interessado(a): Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes
Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia- UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 23 de agosto de 2017, o projeto de pesquisa intitulado **“Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos empregando proteínas recombinantes como alternativas para o diagnóstico da leishmaniose visceral”** 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.


Profa. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

10. APÊNDICES

10.1. Artigos de primeira autoria

10.1.1. Publicação do artigo científico intitulado “*A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant Leishmania hypothetical protein*” pelo periódico internacional *Immunobiology*.



A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant *Leishmania* hypothetical protein

Daniela P. Lage^a, Amanda S. Machado^a, Fernanda F. Ramos^a, Patrícia C. Silveira^b, Daniel S. Dias^a, Patrícia A.F. Ribeiro^a, Grasielle S.V. Tavares^a, Lourena E. Costa^a, Thaís T.O. Santos^a, Bethina T. Steiner^c, Mírian I. Fagundes^c, Miguel A. Chávez-Fumagalli^d, Sandra Lyon^d, Ricardo L.F. Moreira^e, Mariana C. Duarte^{a,b}, Daniel Menezes-Souza^{a,b}, Rachel B. Caligiorne^c, Ricardo A. Machado-de-Ávila^c, Antônio L. Teixeira^{a,f}, Eduardo A.F. Coelho^{a,b,g}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30.130-100, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

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

^d Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, 30622-020, Minas Gerais, Brazil

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Hypothetical proteins
Leishmaniasis
Immunogenicity
Serodiagnosis
Cytokines
Antibodies

ABSTRACT

The measures for leishmaniasis control include the precise diagnosis of disease. However, although several recombinant antigens have been tested with this biotechnological purpose, no effective product exists, which could detect patients with the active disease, as well as differentiates them from cured and treated patients. In this study, a conserved *Leishmania* hypothetical protein, which was identified in *Leishmania infantum* parasites, but evaluated to presents high homology in the amino acid sequences between distinct parasite species, was evaluated for the diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. In addition, PBMCs collected from treated and untreated mucosal leishmaniasis (ML) and visceral leishmaniasis (VL) patients, as well as in healthy subjects living in endemic region of disease, were *in vitro* stimulated, when IFN- γ , IL-4 and IL-10 levels were evaluated in the cell supernatant. Regarding the serological analyses, ELISA experiments using the recombinant protein (rLjHyL) and a human serological panel revealed high sensitivity and specificity values to detect both diseases, while control antigens showed worst results. Regarding the cellular response, results showed that rLjHyL-stimulated cells produced higher IFN- γ and lower IL-4 and IL-10 levels in the supernatants. Also, the anti-protein antibody production was evaluated in these patients, and data showed higher IgG2 and lower IgG1 levels found in the treated patients and healthy controls, demonstrating the stimulation of a Th1-type response induced by the rLjHyL protein. In conclusion, this hypothetical protein can be considered as antigenic in TL and VL, as well as a vaccine candidate to be tested in future studies to protect against disease.

1. Introduction

Leishmaniasis are neglected diseases considered as important public health problem in the world. This disease complex threatens about 380 million people in regions, such as Africa, Asia and Americas; with about two million people affected leading to their morbidity and/or mortality (WHO, 2016). The main clinical manifestations of disease

are comprised between tegumentary (TL) and visceral (VL) leishmaniasis, which present a spectrum of diseases commonly referred to their clinical and pathologic features. Although TL is not a fatal disease, it can manifests as cutaneous leishmaniasis (CL), which may heal spontaneously; mucosal leishmaniasis (ML), which causes hyperergic ulcerative lesions and can progresses in the absence of apparent cellular response; and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), a anergic clinic

^{*} Corresponding author at: Laboratório 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 (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.05.008>

Received 13 April 2019; Received in revised form 8 May 2019; Accepted 28 May 2019

Available online 30 May 2019







0171-2985/ © 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

10.1.2. Publicação do artigo científico intitulado “*Liposomal Formulation of ChimeraT, a Multiple T-Cell Epitope-Containing Recombinant Protein, Is a Candidate Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis*” pelo periódico internacional *Vaccines*.



Article

Liposomal Formulation of ChimeraT, a Multiple T-Cell Epitope-Containing Recombinant Protein, Is a Candidate Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis

Daniela P. Lage ¹, Patrícia A.F. Ribeiro ¹, Daniel S. Dias ¹, Débora V.C. Mendonça ¹, Fernanda F. Ramos ¹, Lívia M. Carvalho ², Bethina T. Steiner ³, Grasielle S.V. Tavares ¹, Vivian T. Martins ¹, Amanda S. Machado ¹, João A. Oliveira-da-Silva ¹, Thaís T.O. Santos ¹ , Camila S. Freitas ¹ , Jamil S. Oliveira ⁴, Bruno M. Roatt ² , Ricardo A. Machado-de-Ávila ³ , Maria V. Humbert ⁵ , Myron Christodoulides ^{5,*†} and Eduardo A.F. Coelho ^{1,†} 

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brazil; danipagliara@hotmail.com (D.P.L.); patty-fernandes@hotmail.com (P.A.F.R.); daniel-sdias@hotmail.com (D.S.D.); deb.s.mendonca@gmail.com (D.V.C.M.); fe.fonsecaramos@gmail.com (F.F.R.); grasysv@hotmail.com (G.S.V.T.); viviantamietti@yahoo.com.br (V.T.M.); manda_sanchez92@hotmail.com (A.S.M.); joaoasilva@gmail.com (J.A.O.-d.-S.); thaisteoli@gmail.com (T.T.O.S.); camilasimoesf@gmail.com (C.S.F.); eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F.C.)

² 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 35400-000, Brazil; livinha_mendes@yahoo.com.br (L.M.C.); bmroatt@gmail.com (B.M.R.)

³ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil; bethina@unes.net (B.T.S.); r_andrez@yahoo.com.br (R.A.M.-d.-Á.)

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina 88806-000, Brazil; jamil_lefqp@yahoo.com.br

⁵ Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital, Southampton SO16 6YD, UK; M.V.Humbert@soton.ac.uk

* Correspondence: mc4@soton.ac.uk; Tel.: +44-02381-205120

† Senior co-authors.

Received: 7 May 2020; Accepted: 6 June 2020; Published: 9 June 2020



Abstract: *Background:* Leishmaniasis are neglected diseases caused by infection with *Leishmania* parasites and there are no human vaccines in use routinely. The purpose of this study was to examine the immunogenicity of ChimeraT, a novel synthetic recombinant vaccine against visceral leishmaniasis (VL), incorporated into a human-compatible liposome formulation. *Methods:* BALB/c mice were immunized subcutaneously with ChimeraT/liposome vaccine, ChimeraT/saponin adjuvant, or ChimeraT/saline and immune responses examined in vitro and in vivo. *Results:* Immunization with the ChimeraT/liposome formulation induced a polarized Th1-type response and significant protection against *L. infantum* infection. ChimeraT/liposome vaccine stimulated significantly high levels of interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-12, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) cytokines by both CD4 and CD8 T-cells, with correspondingly lower levels of IL-4 and IL-10 cytokines. Induced antibodies were predominantly IgG2a isotype, and homologous antigen-stimulated spleen cells produced significant nitrite as a proxy for nitric oxide (NO). Furthermore, we examined a small number of treated VL patients and found higher levels of circulating anti-ChimeraT protein IgG2 antibodies, compared to IgG1 levels. *Conclusions:* Overall, the liposomal formulation of ChimeraT induced a protective Th1-type immune response and thus could be considered in future studies as a vaccine candidate against human VL.

10.2. Demais trabalhos publicados durante o Doutorado

1. TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; PEREIRA, ISABELA A.G.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; RAMOS, FERNANDA F.; **LAGE, DANIELA P.**; MACHADO, AMANDA S.; CARVALHO, LÍVIA M.; REIS, THIAGO A.R.; PERIN, LUÍSA; CARVALHO, ANA MARIA R.S.; OTTONI, FLAVIANO M.; LUDOLF, FERNANDA; FREITAS, CAMILA S.; BANDEIRA, RAQUEL S.; SILVA, ALESSANDRA M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; ALVES, RICARDO J.; ROATT, BRUNO M.; COELHO, EDUARDO A.F. A clioquinol-containing Pluronic® F127 polymeric micelle system is effective in the treatment of visceral leishmaniasis in a murine model. *Parasite*. v.27, p.29 -, 2020.

2. MACHADO, AMANDA S.; RAMOS, FERNANDA F.; SANTOS, THAÍS T.O.; COSTA, LOURENA E.; LUDOLF, FERNANDA; **LAGE, DANIELA P.**; BANDEIRA, RAQUEL S.; TAVARES, GRASIELE S.V.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; STEINER, BETHINA T.; CHAVES, ANA T.; OLIVEIRA, JAMIL S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; DUARTE, MARIANA C.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; LYON, SANDRA; GONÇALVES, DENISE U.; CALIGIORNE, RACHEL B.; COELHO, EDUARDO A.F. 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, p.107941 -, 2020.

3. MACHADO, AMANDA S.; RAMOS, FERNANDA F.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; SANTOS, THAÍS T. O.; TAVARES, GRASIELE S. V.; COSTA, LOURENA E.; **LAGE, DANIELA P.**; TEIXEIRA-FERREIRA, ANDRÉ; PERALES, JONAS; FERNANDES, ANA PAULA; MOREIRA, RICARDO L. F.; DUARTE, MARIANA C.; TUPINAMBÁS, UNAÍ; CALIGIORNE, RACHEL B.; COTA, GLÁUCIA F.; COELHO, EDUARDO A. F.; LUDOLF, FERNANDA An immunoproteomics approach to identify *Leishmania infantum* proteins to be applied for the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection. *Parasitology*, v.147, p.932 - 939, 2020.

4. OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; MACHADO, AMANDA S.; TAVARES, GRASIELE S.V.; RAMOS, FERNANDA F.; **LAGE, DANIELA P.**; LUDOLF, FERNANDA; STEINER, BETHINA T.; REIS, THIAGO A.R.; SANTOS, THAÍS T.O.; COSTA, LOURENA E.; BANDEIRA, RAQUEL S.; MARTINS, VÍVIAN T.; GALVANI, NATHÁLIA C.; CHAVES, ANA T.; OLIVEIRA, JAMIL S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; TUPINAMBÁS, UNAÍ; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; LYON, SANDRA; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; COELHO, EDUARDO A.F. Biotechnological applications from a *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral leishmaniasis. *Microbial pathogenesis*, v.147, p.104283 - , 2020.

5. OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; MACHADO, AMANDA S.; RAMOS, FERNANDA F.; TAVARES, GRASIELE S.V.; **LAGE, DANIELA P.**; LUDOLF, FERNANDA; STEINER, BETHINA T.; REIS, THIAGO A.R.; SANTOS, THAÍS T.O.; COSTA, LOURENA E.; MARTINS, VÍVIAN T.; GALVANI, NATHÁLIA C.;

CHAVES, ANA T.; OLIVEIRA, JAMIL S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; SILVEIRA, JULIA A.G.; MOREIRA, RICARDO L.F.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; TUPINAMBÁS, UNAÍ; GONÇALVES, DENISE U.; COELHO, EDUARDO A.F. Evaluation of *Leishmania infantum* pyridoxal kinase protein for the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Immunology letters*, v.220, p.11 - 20, 2020.

6. RIBEIRO, PATRÍCIA A. F.; DIAS, DANIEL S.; **LAGE, DANIELA P.**; MENDONÇA, DÉBORA V. C.; VALE, DANNIELE L.; RAMOS, FERNANDA F.; CARVALHO, LÍVIA M.; CARVALHO, ANA MARIA R. S.; STEINER, BETHINA T.; ROQUE, MARJORIE C.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; OLIVEIRA, JAMIL S.; TAVARES, GRASIELE S. V.; MARTINS, VÍVIAN T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; MOREIRA, RICARDO L. F.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; DUARTE, MARIANA C.; OLIVEIRA, MÔNICA C.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; COELHO, EDUARDO A. F. Evaluation of the protective efficacy of a *Leishmania* protein associated with distinct adjuvants against visceral leishmaniasis and in vitro immunogenicity in human cells. *Parasitology research*, v.119, p.2609 - 2622, 2020.

7. OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; **LAGE, DANIELA P.**; RAMOS, FERNANDA F.; MACHADO, AMANDA S.; TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; PEREIRA, ISABELA A.G.; MARTINS, VÍVIAN T.; CARVALHO, LÍVIA M.; LUDOLF, FERNANDA; SANTOS, THAÍS T.O.; REIS, THIAGO A.R.; OLIVEIRA, CAMILA S.; BANDEIRA, RAQUEL S.; SILVA, ALESSANDRA M.; COSTA, LOURENA E.; OLIVEIRA, JAMIL S.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; ROATT, BRUNO M.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. *Leishmania infantum* pyridoxal kinase evaluated in a recombinant protein and DNA vaccine to protects against visceral leishmaniasis. *Molecular immunology*, v.124, p.161 - 171, 2020.

8. CUNHA, LAÍS CARDOSO; **LAGE, DANIELA PAGLIARA**; FERREIRA, LORENA SALES; SABOIA-VAHIA, LEONARDO; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ; BELO, VINÍCIUS SILVA; TEIXEIRA-NETO, RAFAEL GONÇALVES; SOARES, LUIS FERNANDO; CHAGAS, RAFAEL CÉSAR RUSSO; DA SILVA, EDUARDO SERGIO Leishmanicidal activity of ibuprofen and its complexes with Ni(II), Mn(II) and Pd(II). *Inorganic chemistry communications*, v.113, p.107756 -, 2020.

9. SOUSA, JESSICA K.T.; ANTINARELLI, LUCIANA M.R.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; **LAGE, DANIELA P.**; TAVARES, GRASIELE S.V.; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; LUDOLF, FERNANDA; COELHO, VINICIO T.S.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; PERIN, LUÍSA; OLIVEIRA, BIANKA A.; ALVARENGA, DENIS F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; BRANDÃO, GERALDO C.; NOBRE, VANDACK; PEREIRA, GUILHERME R.; COIMBRA, ELAINE S.; COELHO, EDUARDO A.F. A chloroquinoline derivate presents effective in vitro and in vivo antileishmanial activity against *Leishmania* species that cause tegumentary and visceral leishmaniasis. *Parasitology international*, v.1, p.101966, 2019.

10. TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; MIYAZAKI,

CAROLINA K.; **LAGE, DANIELA P.**; SOYER, TAUANE G.; CARVALHO, LÍVIA M.; OTTONI, FLAVIANO M.; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; ANTINARELLI, LUCIANA M.R.; LUDOLF, FERNANDA; DUARTE, MARIANA C.; COIMBRA, ELAINE S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; BARICHELLO, JOSÉ MÁRIO; ALVES, RICARDO J.; COELHO, EDUARDO A.F. A Pluronic® F127-based polymeric micelle system containing an antileishmanial molecule is immunotherapeutic and effective in the treatment against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology international*, v.68, p.63 - 72, 2019.

11. VALE, DANNIELE L.; DIAS, DANIEL S.; MACHADO, AMANDA S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; **LAGE, DANIELA P.**; COSTA, LOURENA E.; STEINER, BETHINA T.; TAVARES, GRASIELE S.V.; RAMOS, FERNANDA F.; MARTÍNEZ-RODRIGO, ABEL; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; CALIGIORNE, RACHEL B.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; COELHO, EDUARDO A.F.

Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v.95, p.134 - 143, 2019.

12. MACHADO, JULIANA M.; COSTA, LOURENA E.; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; MARTINS, VÍVIAN T.; **LAGE, DANIELA P.**; CARVALHO, GERUSA B.; FRANKLIN, MICHELLE L.; TAVARES, GRASIELE S.V.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; MACHADO, AMANDA S.; RAMOS, LUANA S.; NOGUEIRA, LAIS M.; MARIANO, REYSLA M.S.; MOURA, HENRIQUE B.; SILVA, EDUARDO S.; TEIXEIRA-NETO, RAFAEL G.; CAMPOS-DA-PAZ, MARIANA; GALDINO, ALEXSANDRO S.; COELHO, EDUARDO A.F. Diagnostic markers selected by immunoproteomics and phage display applied for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Research in veterinary science*, v.126, p.4 - 8, 2019.

13. SOYER, TAUANE G.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; TAVARES, GRASIELE S.V.; **LAGE, DANIELA P.**; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; PERIN, LUISA; LUDOLF, FERNANDA; COELHO, VINICIO T.S.; FERREIRA, ANDREZA C.G.; NEVES, PEDRO H.A.S.; MATOS, GUILHERME F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; COIMBRA, ELAINE S.; PEREIRA, GUILHERME R.; COELHO, EDUARDO A.F.; ANTINARELLI, LUCIANA M.R. Evaluation of the in vitro and in vivo antileishmanial activity of a chloroquinolin derivative against *Leishmania* species capable of causing tegumentary and visceral leishmaniasis. *Experimental parasitology*, v.199, p.30 - 37, 2019.

14. RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; DIAS, DANIEL S.; **LAGE, DANIELA P.**; MARTINS, VÍVIAN T.; COSTA, LOURENA E.; SANTOS, THAÍS T.O.; RAMOS, FERNANDA F.; TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; LUDOLF, FERNANDA; GOMES, DAWIDSON A.; RODRIGUES, MICHELE A.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; SILVA, EDUARDO S.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; DUARTE, MARIANA C.; ROATT, BRUNO M.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; TEIXEIRA, ANTONIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. Immunogenicity and protective efficacy of a new *Leishmania* hypothetical protein applied as a DNA vaccine or in a recombinant form against *Leishmania infantum* infection. *Molecular immunology*, v.106,

p.108 - 118, 2019.

15. MENDONÇA, DÉBORA V.C.; TAVARES, GRASIELE S.V.; **LAGE, DANIELA P.**; SOYER, TAUANE G.; CARVALHO, LÍVIA M.; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; OTTONI, FLAVIANO M.; ANTINARELLI, LUCIANA M.R.; VALE, DANNIELE L.; LUDOLF, FERNANDA; DUARTE, MARIANA C.; COIMBRA, ELAINE S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; BARICHELLO, JOSÉ MÁRIO; ALVES, RICARDO J.; COELHO, EDUARDO A.F. In vivo antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v.109, p.779 - 787, 2019.

16. SANTOS, THAÍS T.O.; CARDOSO, MARIANA S.; MACHADO, AMANDA S.; SIQUEIRA, WILLIANE F.; RAMOS, FERNANDA F.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; TAVARES, GRASIELE S.V.; **LAGE, DANIELA P.**; COSTA, LOURENA E.; DE FREITAS, CAMILA S.; MARTINS, VÍVIAN T.; BANDEIRA, RAQUEL S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; LYON, SANDRA; MOREIRA, RICARDO L.F.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; TUPINAMBÁS, UNAÍ; CALIGIORNE, RACHEL B.; CHAVES, ANA THEREZA; ROCHA, MANOEL O.C.; FUJIWARA, RICARDO T.; COELHO, EDUARDO A.F. 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, p.103783 - , 2019.

17. CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL; SCHNEIDER, MÔNICA SANTOS; **LAGE, DANIELA PAGLIARA**; TAVARES, GRASIELE DE SOUSA VIEIRA; MENDONÇA, DÉBORA VASCONCELOS COSTA; SANTOS, THAÍS TEODORO DE OLIVEIRA; PÁDUA, RODRIGO MAIA; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO ANDREZ; LEITE, JOÃO PAULO VIANA; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ A Computational Approach Using Bioinformatics to Screening Drug Targets for *Leishmania infantum* Species. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine., v.2018, p.1 - 9, 2018.

18. RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; DIAS, DANIEL S.; **LAGE, DANIELA P.**; COSTA, LOURENA E.; SALLES, BEATRIZ C.S.; STEINER, BETHINA T.; RAMOS, FERNANDA F.; LIMA, MARIANA P.; SANTOS, THAÍS T.O.; CHAVES, ANA T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; FUJIWARA, RICARDO T.; BUENO, LÍLIAN L.; CALIGIORNE, RACHEL B.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; GONÇALVES, DENISE U.; COELHO, EDUARDO A.F. 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 diseases*, v.92, p.196 - 203, 2018.

19. RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; DIAS, DANIEL S.; NOVAIS, MARCUS V.M.; **LAGE, DANIELA P.**; TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; OLIVEIRA, JAMIL S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; LUDOLF, FERNANDA; TAVARES, CARLOS A.P.; OLIVEIRA, MÔNICA C.; COELHO, EDUARDO A.F. A *Leishmania* hypothetical protein-containing liposome-based formulation is highly

immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. *Cytokine*, v.111, p.131 - 139, 2018.

20. DE SOUSA VIEIRA TAVARES, GRASIELE; MENDONÇA, DÉBORA VASCONCELOS COSTA; **LAGE, DANIELA PAGLIARA**; DA TRINDADE GRANATO, JULIANA; OTTONI, FLAVIANO MELO; LUDOLF, FERNANDA; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL; DUARTE, MARIANA COSTA; TAVARES, CARLOS ALBERTO PEREIRA; ALVES, RICARDO JOSÉ; COIMBRA, ELAINE SOARES; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ Antileishmanial activity, cytotoxicity and mechanism of action of clioquinol against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* species. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v.123, p.236 - 246, 2018.

21. MENDONÇA, DÉBORA V.C.; MARTINS, VÍVIAN T.; **LAGE, DANIELA P.**; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; CARVALHO, ANA MARIA R.S.; DIAS, ANNA LETÍCIA T.; MIYAZAKI, CAROLINA K.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; ROATT, BRUNO M.; TAVARES, CARLOS A.P.; BARICHELLO, JOSÉ MÁRIO; DUARTE, MARIANA C.; COELHO, EDUARDO A.F. Comparing the therapeutic efficacy of different amphotericin B-carrying delivery systems against visceral leishmaniasis. *Experimental parasitology*, v.186, p.24 - 35, 2018.

22. LIMA, MARIANA P.; COSTA, LOURENA E.; **LAGE, DANIELA P.**; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; MACHADO, AMANDA S.; RAMOS, FERNANDA F.; SALLES, BEATRIZ C.S.; FAGUNDES, MIRIAN I.; CARVALHO, GERUSA B.; FRANKLIN, MICHELLE L.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; DUARTE, MARIANA C.; TEIXEIRA, ANTONIO L.; GONÇALVES, DENISE U.; COELHO, EDUARDO A.F. 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.766, p.1 -, 2018.

23. RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; DIAS, DANIEL S.; **LAGE, DANIELA P.**; COSTA, LOURENA E.; MARTINS, VÍVIAN T.; TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; LIMA, MARIANA P.; OLIVEIRA, JAMIL S.; STEINER, BETHINA T.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; ROATT, BRUNO M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; DUARTE, MARIANA C.; TEIXEIRA, ANTONIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. Evaluation of a *Leishmania* hypothetical protein administered as DNA vaccine or recombinant protein against *Leishmania infantum* infection and its immunogenicity in humans. *Cellular immunology*, v 331, p.67 - 77, 2018.

24. CARVALHO, GERUSA B.; COSTA, LOURENA E.; **LAGE, DANIELA P.**; RAMOS, FERNANDA F.; SANTOS, THAÍS T. O.; RIBEIRO, PATRÍCIA A. F.; DIAS, DANIEL S.; SALLES, BEATRIZ C. S.; LIMA, MARIANA P.; CARVALHO, LÍVIA M.; DIAS, ANA C. S.; ALVES, PATRÍCIA T.; FRANKLIN, MICHELLE L.; SILVA, RENATA A. M.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; ROATT, BRUNO M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; GOULART, LUIZ RICARDO; TEIXEIRA, ANTONIO L.; COELHO, EDUARDO A. F. High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis

patients and their use as vaccine candidates against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*, v.867, p.1 - 11, 2018.

25. SALLES, BEATRIZ C.S.; DIAS, DANIEL S.; STEINER, BETHINA T.; **LAGE, DANIELA P.**; RAMOS, FERNANDA F.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; SANTOS, THAÍS T.O.; LIMA, MARIANA P.; COSTA, LOURENA E.; CHAVES, ANA T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; FUJIWARAA, RICARDO T.; BUENOA, LÍLIAN L.; CALIGIORNE, RACHEL B.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; GONÇALVES, DENISE U.; COELHO, EDUARDO A.F. 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.634, p.1 -, 2018.

26. DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; MARTINS, VÍVIAN T.; **LAGE, DANIELA P.**; RAMOS, FERNANDA F.; DIAS, ANNA L.T.; RODRIGUES, MARCELLA R.; PORTELA, ÁQUILA S.B.; COSTA, LOURENA E.; CALIGIORNE, RACHEL B.; STEINER, BETHINA T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; SALLES, BEATRIZ C.S.; SANTOS, THAÍS T.O.; SILVEIRA, JULIA A.G.; MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; ROATT, BRUNO M.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; SILVA, EDUARDO S.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; COELHO, EDUARDO A.F. Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. *Cellular immunology*, v.323, p.59 - 69, 2018.

27. DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; SALLES, BEATRIZ C.S.; SANTOS, THAÍS T.O.; RAMOS, FERNANDA F.; **LAGE, DANIELA P.**; COSTA, LOURENA E.; PORTELA, AQUILA S.B.; CARVALHO, GERUSA B.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; CALIGIORNE, RACHEL B.; OLIVEIRA, JAMIL S.; MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVA, EDUARDO S.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; DUARTE, MARIANA C.; GONÇALVES, DENISE U.; COELHO, EDUARDO A.F. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitology international*, v.67, p.344 - 350, 2018.

28. OLIVEIRA, MARCELO; MARTINS, VÍVIAN; SANTOS, THAÍS; **LAGE, DANIELA**; RAMOS, FERNANDA; SALLES, BEATRIZ; COSTA, LOURENA; DIAS, DANIEL; RIBEIRO, PATRÍCIA; SCHNEIDER, MÔNICA; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO; TEIXEIRA, ANTÔNIO; COELHO, EDUARDO; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL Small Myristoylated Protein-3, Identified as a Potential Virulence Factor in *Leishmania amazonensis*, Proves to be a Protective Antigen against Visceral Leishmaniasis. *International journal of molecular sciences*, v.19, p.129 -, 2018.

29. DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; MARTINS, VÍVIAN T.; **LAGE, DANIELA P.**; COSTA, LOURENA E.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; RAMOS, FERNANDA F.; SANTOS, THAÍS T.O.; LUDOLF, FERNANDA; OLIVEIRA, JAMIL S.; MENDES, TIAGO A.O.; SILVA, EDUARDO S.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; DUARTE, MARIANA C.; ROATT, BRUNO M.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; TEIXEIRA, ANTONIO L.; COELHO, EDUARDO A.F.

Vaccination with a CD4 + and CD8 + T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. *Translational Research*, v.767, p.1 -, 2018.

30. MARTINS, VÍVIAN T.; **LAGE, DANIELA P.**; DUARTE, MARIANA C.; CARVALHO, ANA MARIA R.S.; COSTA, LOURENA E.; MENDES, TIAGO A.O.; VALE, DANNIELE L.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; ROATT, BRUNO M.; TAVARES, CARLOS A.P.; SOTO, MANUEL; COELHO, EDUARDO A.F. A recombinant fusion protein displaying murine and human MHC class I- and II-specific epitopes protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Cellular immunology*, v.313, p.32 - 42, 2017.

31. CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; SCHNEIDER, MÔNICA S.; **LAGE, DANIELA P.**; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; COELHO, EDUARDO A.F. An in silico functional annotation and screening of potential drug targets derived from *Leishmania spp.* hypothetical proteins identified by immunoproteomics. *Experimental Parasitology*, v.176, p.66 - 74, 2017.

32. DIAS, DANIEL S.; MARTINS, VÍVIAN T.; RIBEIRO, PATRÍCIA A. F.; RAMOS, FERNANDA F.; **LAGE, DANIELA P.**; TAVARES, GRASIELE S. V.; MENDONÇA, DÉBORA V. C.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; OLIVEIRA, JAMIL S.; SILVA, EDUARDO S.; GOMES, DAWIDSON A.; RODRIGUES, MICHELE A.; DUARTE, MARIANA C.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; COELHO, EDUARDO A. F. Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of a conserved *Leishmania* hypothetical protein against visceral leishmaniasis. *Parasitology*, v.878, p.1 - 12, 2017.

33. MENDONÇA, DÉBORA VASCONCELOS COSTA; **LAGE, DANIELA PAGLIARA**; CALIXTO, STEPHANE LIMA; OTTONI, FLAVIANO MELO; TAVARES, GRASIELE DE SOUSA VIEIRA; LUDOLF, FERNANDA; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL; SCHNEIDER, MÔNICA SANTOS; DUARTE, MARIANA COSTA; TAVARES, CARLOS ALBERTO PEREIRA; ALVES, RICARDO JOSÉ; COIMBRA, ELAINE SOARES; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. *Parasitology research*, v.221, p.1 - , 2017.

34. DUARTE, MARIANA COSTA; **LAGE, DANIELA PAGLIARA**; MARTINS, VÍVIAN TAMIETTI; COSTA, LOURENA EMANUELE; SILVEIRA SALLES, BEATRIZ CRISTINA; SEVERINO CARVALHO, ANA MARIA RAVENA; DE OLIVEIRA SANTOS, THAÍS TEODORO; DIAS, DANIEL SILVA; FERNANDES RIBEIRO, PATRÍCIA APARECIDA; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO ANDREZ; ROATT, BRUNO MENDES; MENEZES-SOUZA, DANIEL; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE FERREIRA; FERRAZ COELHO, EDUARDO ANTONIO Performance of *Leishmania braziliensis* enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Veterinary parasitology*, v.238, p.77 - 81, 2017.

35. SANTOS, THAÍS T.O.; MARTINS, VÍVIAN T.; **LAGE, DANIELA P.**; COSTA,

LOURENA E.; SALLES, BEATRIZ C.S.; CARVALHO, ANA M.R.S.; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; ROATT, BRUNO M.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; COELHO, EDUARDO A.F.; DUARTE, MARIANA C. Probing the efficacy of a heterologous *Leishmania/L. Viannia braziliensis* recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of *L. infantum* in BALB/c mice. *Acta Tropica*, v.101, p.1 - 10, 2017.

36. DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; MARTINS, VÍVIAN T.; **LAGE, DANIELA P.**; PORTELA, ÁQUILA S.B.; COSTA, LOURENA E.; SALLES, BEATRIZ C.S.; LIMA, MARIANA P.; RAMOS, FERNANDA F.; SANTOS, THAÍS T.O.; CALIGIORNE, RACHEL B.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; SILVEIRA, JULIA A.G.; MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; GONÇALVES, DENISE U.; OLIVEIRA, JAMIL S.; ROATT, BRUNO M.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; SILVA, EDUARDO S.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; TEIXEIRA, ANTONIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. Recombinant small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein of *Leishmania infantum*: Potential vaccine and diagnostic application against visceral leishmaniasis. *Molecular immunology*, v.91, p.272 - 281, 2017.

37. RAMOS, FERNANDA FONSECA; COSTA, LOURENA EMANUELE; DIAS, DANIEL SILVA; SANTOS, THAÍS TEODORO OLIVEIRA; RODRIGUES, MARCELLA REZENDE; **LAGE, DANIELA PAGLIARA**; SALLES, BEATRIZ CRISTINA SILVEIRA; MARTINS, VÍVIAN TAMIETTI; RIBEIRO, PATRÍCIA APARECIDA FERNANDES; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL; DIAS, ANA CAROLINA SILVA; ALVES, PATRÍCIA TERRA; VIEIRA, ÉRICA LEANDRO MARCIANO; ROATT, BRUNO MENDES; MENEZES-SOUZA, DANIEL; DUARTE, MARIANA COSTA; TEIXEIRA, ANTONIO LÚCIO; GOULART, LUIZ RICARDO; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. *Parasites & Vectors*, v.10, p.1 -, 2017.

38. LAVORATO, STEFÂNIA N.; DUARTE, MARIANA C.; **LAGE, DANIELA P.**; TAVARES, CARLOS A. P.; COELHO, EDUARDO A. F.; ALVES, RICARDO J. Synthesis and antileishmanial activity of 1,3-bis(aryloxy)propan-2-amines. *Medicinal Chemistry Research (Print)*. v.1805, p.1 - 21, 2017.

39. LAVORATO, STEFÂNIA N.; DUARTE, MARIANA C.; **LAGE, DANIELA P.**; TAVARES, CARLOS A. P.; COELHO, EDUARDO A. F.; ALVES, RICARDO J. 1,3-Bis(aryloxy)propan-2-ols as potential antileishmanial agents. *Chemical Biology & Drug Design*, v.6545, p.1 - 6, 2017.