

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

GUILHERME CAETANO GARCIA

**“DESENVOLVIMENTO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTIEPÍTOPO DE
LINFÓCITOS B PARA USO COMO ANTÍGENO NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA”**

Belo Horizonte - MG

Julho/2020

GUILHERME CAETANO GARCIA

**“DESENVOLVIMENTO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTIEPÍTOPO DE
LINFÓCITOS B PARA USO COMO ANTÍGENO NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR 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 à obtenção do título de Doutor junto ao referido programa.

Orientador:

Prof. Dr. Daniel Menezes Souza - UFMG

Co-Orientadores:

Prof^ª. Dr^ª. Mariana C Duarte – UFMG

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho - UFMG

Belo Horizonte - MG

Julho/2020

G216d Garcia, Guilherme Caetano.
“Desenvolvimento de uma Proteína Quimérica Multiepítopo de Linfócitos B para uso como Antígeno no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Humana” [recurso eletrônico]. / Guilherme Caetano Garcia. - - Belo Horizonte: 2020. 106f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Daniel Menezes Souza.
Coorientador (a): Mariana C. Duarte; Eduardo Antônio Ferraz Coelho.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Proteínas Recombinantes de Fusão. 2. Epitopos de Linfócito B. 3. Antígenos. 4. Testes Sorológicos. 5. Leishmaniose Cutânea. 6. Dissertação Acadêmica. I. Souza, Daniel Menezes. II. Duarte, Mariana C.. III. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QU 55



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

***"DESENVOLVIMENTO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTIEPÍTOPO DE LINFÓCITOS B
PARA USO COMO ANTÍGENO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR HUMANA"***

GUILHERME CAETANO GARCIA

Atesto, para os devidos fins, que a defesa de tese do aluno **GUILHERME CAETANO GARCIA**, número de registro 2016707466, defendida publicamente em 31 de julho de 2020, às 09:00 horas, no Canal do CETES - Plataforma LIFESIZE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, intitulada **"Desenvolvimento de uma proteína quimérica multiepítipo de linfócitos B para uso como antígeno no diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar humana"**, com a Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. DANIEL MENEZES SOUZA - ORIENTADOR (UFMG)**, **PROFA. MARIANA COSTA DUARTE – COORIENTADORA (UFMG)**, **DRA. LOURENA EMANUELE COSTA (UFMG)**, **DRA. VIVIAN TAMIETTI MARTINS (UFMG)**, **PROF. BRUNO MENDES ROATT (UFOP)**, **DR. RORY CRISTIANE FORTES DE BRITO (UFOP)**, foi aprovada por unanimidade, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Belo Horizonte, 27 de maio de 2025.

EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Infectologia e Medicina Tropical



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 27/05/2025, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4245216** e o código CRC **31FAE87B**.

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 Antônio Ferraz Coelho

SUBCOORDENADOR: Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Profa. Mariângela Carneiro

Profa. Mariana Costa Duarte

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses, no departamento de Patologia Clínica do Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais, tendo como orientador o professor Doutor Daniel Menezes Souza e, como co-orientadores, o professor Doutor Eduardo Antonio Ferraz Coelho e a professora Doutora Mariana Costa Duarte.

COLABORADORES

Doutoranda Ana Maria Ravena Severino Carvalho - UFMG

Doutoranda Dênia Monteiro de Moura Franco - UFMG

Doutoranda Fernanda Alvarenga Cardoso Medeiros - UFMG

Prof. Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes - UFV

Prof^ª. Dr^ª. Denise Utsch Gonçalves - UFMG

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 23038.004862/2015-74)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - (309939/2016-0, 408408/2016-2, 311426/2019-0 e 3130702018-0)

FAPEMIG - Edital Universal – (APQ-02737-15, APQ-03599-18 e APQ-03821-18)

Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC/UFMG) -

Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG-87-05/2016)

Dedico:

*Aos meus amados pais, Antonio José Garcia e Sueli
Maria Caetano Garcia, que não mediram esforços e
sonharam comigo, me dando todo o apoio que precisei.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar nos caminhos, mesmo quando a minha fé vacila e à Nossa Senhora da Medalha Milagrosa, por sua maternal intercessão.

Aos meus pais, Antonio José Garcia e Sueli Maria Caetano Garcia pelo apoio incondicional, amor, pelos ensinamentos e pelo exemplo. Se cheguei até aqui, é porque vocês nunca falharam comigo. Meu amor eterno e minha gratidão.

A minha irmã Carolina Caetano Garcia e ao meu cunhado Savio Gonçalves dos Santos pelo carinho de sempre, pelos bons momentos e por terem me dado a chance de fazer uma das experiências mais incríveis da minha vida: ser tio e padrinho. E ao Bernardo, por trazer tantas alegrias, risadas e me ensinar que o amor só cresce.

A toda a minha família! Vocês sempre tiveram uma palavra amiga, de força e estímulo para me oferecer. Meu amor e gratidão a vocês.

A Eli, que tanto me ajudou com conversas, sempre dando uma palavra de apoio e cuidando de tudo em Uberaba desde que me ausentei para dedicar-me ao doutorado. Obrigado por tanto carinho. Minha família é também a sua família.

Aos meus amigos que guardo com carinho no coração, os quais não vou mencionar mas sabem quem são. Obrigado pelos momentos saudáveis, por todo o carinho e pelo apoio. Vocês são incríveis!

Aos queridos Joely Ferreira Figueiredo Bittar, Márcio Sobreira Silva Araújo e Cláudia Natália Ferreira pelo exemplo de pessoas e de pesquisadores que são para mim. Vocês fizeram a diferença em minha trajetória e me sinto honrado em chamá-los de meus amigos.

Às professoras da banca de qualificação, Lourena Emanuele Costa, Ana Thereza Chaves e Mariana Santos Cardoso pelas valiosas considerações feitas objetivando a melhoria do trabalho.

Aos amigos de jornada e de laboratório: Ana Maria Ravena, Carolina Kei, Daniela Pagliara, Danniele Vale, Débora Mendonça, Dênia Monteiro, Fernanda Fonseca, Grasielle Tavares, Lucas Magno e Vívian Tamiatti pelos bons momentos, trocas de experiências, risadas e aprendizado.

Ao meu orientador Daniel Menezes Souza, bem como aos meus co-orientadores Mariana Costa Duarte e Eduardo Antonio Ferraz Coelho, pela oportunidade de trabalho e pelas lições aprendidas.

Aos professores, técnicos, profissionais de limpeza, zeladoria, porteiros, enfim, a todos que trabalham por uma educação de qualidade, por manterem a universidade funcionando e por acreditarem em um país melhor. Não lhes falte a força e o amor para continuarem sua missão.

A todos vocês, o meu muito obrigado!

*“Muitas vezes, as pessoas são egocêntricas,
ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.
Se você é gentil,
as pessoas podem acusá-lo de egoísta,
interesseiro.
Seja gentil assim mesmo.
Se você é um vencedor,
terá alguns falsos amigos e
alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.
Se você é honesto e franco,
as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto e franco assim mesmo.
O bem que você faz hoje,
Pode ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.
Se você tem paz e é feliz,
as pessoas podem sentir inveja.
Seja Feliz assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de você,
mas misso pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.
Veja você que no final das contas,
é entre você e Deus.
Nunca foi entre você e as outras pessoas.”*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é um parasito de notável importância, responsável pela maioria dos casos de leishmaniose tegumentar humana, principalmente no Brasil, causando um amplo espectro de manifestações clínicas e imunopatológicas: a leishmaniose cutânea ou mucosa. O diagnóstico é realizado por meio da associação de inquéritos clínicos e epidemiológicos com exames laboratoriais (métodos diretos e indiretos). O diagnóstico precoce é essencial para evitar danos permanentes e sequelas funcionais graves, identificar casos de falha terapêutica e prevenir efeitos adversos causados pela abordagem terapêutica baseada em diagnósticos errôneos, uma vez que o alto perfil de toxicidade dos medicamentos disponíveis para tratamento deve ser considerado. Atualmente, nenhum dos testes laboratoriais disponíveis pode ser considerado como padrão-ouro, por não possuírem precisão satisfatória para a detecção da doença. Além disso, o teste de intradermoreação de Montenegro, que identificava uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia a antígenos parasitários em pacientes infectados, e que era essencial para apoiar infectologistas no diagnóstico diferencial e no manejo clínico de indivíduos infectados não está mais disponível no Brasil. Assim, existe uma necessidade de descobrir novos antígenos para o desenvolvimento de testes diagnósticos de alta qualidade a serem empregados em áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar humana. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi obter um antígeno mais refinado derivado de *L. braziliensis* para ser aplicado em ensaios sorológicos. Para isso, desenvolvemos um gene que contém a fusão de sequências que codificam treze epítomos lineares com elevada capacidade para serem reconhecidos por células B a partir de proteínas de *L. braziliensis* expressas no estágio amastigota, reconhecidas por soros de pacientes com as formas clínicas cutânea e mucosa, para produzir uma proteína quimérica recombinante (rChiP). Também foi realizada uma análise comparativa com os resultados obtidos no ELISA empregando o antígeno solúvel de *L. braziliensis* (SLb-Antigen) e no teste de imunofluorescência disponível em um laboratório de referência na técnica (Bio-Manguinhos, Brasil). A estratégia utilizada neste trabalho foi bem-sucedida no desenvolvimento de um potencial antígeno a ser empregado em ensaios imunológicos, confirmados por excelentes resultados de sensibilidade (100,0%) na detecção de casos de formas cutânea e mucosa, simultaneamente com excelente valor de especificidade (100,0%), o que excluiu a ocorrência de resultados falso-positivos em indivíduos saudáveis e em pacientes com doença de Chagas, comumente associados à reatividade cruzada com espécies

de *Leishmania* em áreas endêmicas. A presente tecnologia também abre uma porta para investimentos futuros para seu emprego em exames de campo por meio de um teste imunocromatográfico, que será ainda mais útil em regiões onde a estrutura laboratorial pode não estar disponível ou é escassa.

Palavras chave: proteínas recombinantes de fusão; epítomos de linfócitos B; antígenos; testes sorológicos; leishmaniose cutânea.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is a parasite of great importance responsible for most cases of human tegumentary leishmaniasis, especially in Brazil, causing a wide spectrum of clinical and immunopathological manifestations, including cutaneous or mucosal leishmaniasis. The association of clinical and epidemiological inquiries with laboratory tests (both direct and indirect methods) helps diagnosing human tegumentary leishmaniasis. Early diagnosis is essential to avoid permanent damage and severe functional sequelae, to identify cases of therapeutic failure and to prevent adverse effects caused by therapeutic approaches based on misdiagnosis. The high toxicity profile of the available drugs for treatment must be considered. None of the laboratory tests currently available can be considered the gold standard, as they do not have satisfactory accuracy for disease detection. Furthermore, the Montenegro Skin Test, which identifies a delayed-type hypersensitivity response to parasite antigens in infected patients, is no longer available in Brazil. This test Skin was an essential test to support infectologists in the differential diagnosis and clinical management of infected individuals. Therefore, there is an urgent need to discover new antigens for the development of high-quality diagnostic tests to be employed in endemic areas for Human tegumentar leishmaniasis. In this sense, the purpose of this study was to obtain a more refined antigen of *L. braziliensis* to be applied to the serological assays. To achieve this, we developed a gene containing the fusion of sequences encoding thirteen linear B-cell epitopes from proteins of *L. braziliensis* expressed in the amastigote stage, which are recognized by serum from patients with cutaneous and mucosal leishmaniasis, to produce a recombinant chimeric protein (rChiP). We also performed a comparative analysis with results obtained from ELISA employing soluble *L. braziliensis* antigen (SLb-Antigen) and a reference laboratory by the immunofluorescent assay (Bio- Manguinhos, Brazil). The rational strategy used in this work was successful in developing a potential antigen to be used in immunological assays to Human tegumentary leishmaniasis, confirmed by excellent sensitivity results (100.0%) in the detection of cutaneous and mucosal cases, simultaneously with excellent value of specificity (100.0%), which excluded the occurrence of false positive results in healthy individuals and in patients with Chagas' disease, commonly associated with cross-reactivity with *Leishmania* species in endemic areas. The present technology also opens a door for future investment for its use in field exams via an immunocromatographic test, which will be even more helpful in regions where laboratory structure is not available or scarce.

Keywords: recombinant fusion proteins; B lymphocyte epitopes; antigens; serological tests; cutaneous leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i> spp.-----	23
Figura 2: Casos de LTH no Brasil por UF no ano de 2015-----	24
Figura 3: Fluxograma com o percurso seguido na seleção dos alvos a comporem a proteína quimérica-----	45
Figura 4: Fluxograma com o percurso seguido na síntese, expressão, purificação e padronização de teste ELISA para diagnóstico da LTH-----	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de sensibilidade e especificidade obtidos no teste de IDRM por diferentes autores-----	28
Tabela 2: Valores de sensibilidade e especificidade obtidos em testes diretos por diferentes autores-----	29
Tabela 3: Valores de sensibilidade e especificidade obtidos em testes indiretos por diferentes autores-----	33

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	- <i>Accuracy</i> / Acurácia
ATL	- <i>American Tegumentary Leishmaniasis</i>
BCA	- <i>Bicinchoninic Acid Assay</i> / Ensaio Ácido Bicinconínico
BSA	- <i>Bovine Serum Albumin</i> / Soroalbumina bovina
CD	- <i>Chagas` disease</i>
CI	- <i>Confidence Interval</i> / Intervalo de confiança
COX	- <i>Cytochrome oxidase</i>
CL	- <i>Cutaneous leishmaniasis</i>
DAT	- <i>Direct agglutination test</i> / Teste de aglutinação direta
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
DTH	- <i>Delayed-type hypersensitivity</i> /Hipersensibilidade do tipo tardia
DC	- Doença de Chagas
EIF	- <i>Eukaryotic initiation factor</i>
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
g	- <i>gravity</i>
HSP	- <i>Heat shock protein</i>
HTL	- <i>Human tegumentary leishmaniasis</i>
Ig	- <i>Imunoglobulin</i> / Imunoglobulina
IHA	- <i>Indirect hemmagglutination assay</i> / Ensaio de hemaglutinação indireta
IPTG	- <i>isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside</i>
IFI	- Imunofluorescência indireta
IFA	- <i>Imunofluorescence assay</i>
IUPAC	- <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IURs	- <i>Intrinsically unstructured regions</i>
KDNA	- <i>Kinetoplast deoxyribonucleic acid</i>
Kv	- Kilovolts
kDa	- Kilodaltons
Log	- Logarithmic / Logarítmica
LTH	- Leishmaniose tegumentar humana
min	- <i>Minutes</i> / minutos
MHz	- <i>Megahertz</i>

mL	- <i>Mililiters / Mililitros</i>
ML	- <i>Mucosal leishmaniasis</i>
mM	- <i>Milimolar / Milimolar</i>
MORN	- <i>Membrane orientation and recognition nexus</i>
MS	- <i>Mass spectrometry / Espectrometria de massa</i>
MST	- <i>Montenegro skin test / Teste de intradermoreação de Montenegro</i>
N	- <i>Normal</i>
ng	- <i>Nanograms/ nanogramas</i>
NPV	- <i>Negative predictive value/ Valor preditivo negativo</i>
OD	- <i>Optical density / Densidade óptica</i>
PBS	- <i>Phosphate buffered saline / Tampão fosfato salino</i>
PCR	- <i>Polimerase chain reaction / Reação em cadeia da Polimerase</i>
pH	- <i>Potential of hydrogen / Potencial hidrogeniônico</i>
PMSF	- <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride / Fluoreto de fenilmetilsulfonila</i>
PPV	- <i>Positive predictive value / Valor preditivo positivo</i>
PRP	- <i>Paraflagellar rod protein</i>
r	- <i>recombinante</i>
rChiP	- <i>Recombinant chimeric protein</i>
RCP	- <i>Repeat containing protein</i>
ROC	- <i>Receiver operating characteristic</i>
RPM	- <i>Revolutions per minute / Rotações por minuto</i>
SDS-PAGE	- <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis / Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio</i>
Se	- <i>Sensitivity / Sensibilidade</i>
Sp	- <i>Specificity / Especificidade</i>
SINAN	- <i>Sistema de Informação de Agravos de Notificação</i>
SLb	- <i>Soluble/ Solúvel</i>
TAE	- <i>Tris-Acetate-EDTA / EDTA tris-acetato</i>
TEF	- <i>Translation elongation factor</i>
TL	- <i>Tegumentary leishmaniasis</i>
UF	- <i>Unidade Federativa</i>
UFMG	- <i>Universidade Federal de Minas Gerais</i>
µL	- <i>Microliters / Microlitros</i>

WB	- <i>Western blotting</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i>
2-DE	- <i>Two-dimensional</i> / Bi-dimensional
2XYT	- <i>Yeast extract Tryptone</i> / Extrato de triptona e levedura
°C	- <i>Degree centigrade</i> / Graus centígrados

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	20
2 - REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 – Etiologia e ciclo biológico do parasito <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	22
2.2 – Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Humana	23
2.3 – Manifestações clínicas da LTH.....	24
2.4 – Medidas de prevenção, controle e tratamento da LTH.....	26
2.5 - Diagnóstico da LTH	26
2.5.1 - Métodos de Diagnóstico Clínico-Epidemiológico	27
2.5.2 - Diagnóstico Laboratorial por Métodos Diretos	28
2.5.3 - Diagnóstico Laboratorial por Métodos Indiretos.....	31
2.6 – O papel das proteínas selecionadas na composição da proteína quimérica.....	36
2.7 – Novas tecnologias com potencial aplicabilidade no diagnóstico da LTH.....	38
3 - JUSTIFICATIVA.....	42
4 - OBJETIVOS.....	43
4.1 - Objetivo geral	43
4.2 - Objetivo específicos	43
4.2.1 – Fase I.....	43
4.2.2 – Fase II.....	44
5 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
6. METODOLOGIA.....	47
6.1 – Aspectos éticos	47
6.2 – Amostras de soros de pacientes	47
6.3 – Parasitos	47
6.4 – Seleção de alvos a comporem a proteína quimérica	47
6.5 – Ligação do gene em pGEM®-T Easy Vector Systems	49
6.6 – Transformação e expressão da proteína quimérica.....	49
6.7 – Padronização de ensaio imunoenzimático ELISA.....	51
6.8 – Análise Estatística.....	52
7. RESULTADOS	53
8. CONCLUSÃO.....	67
9. PERSPECTIVAS.....	68
10. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO.....	69
11. REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	86

Anexo 1: Pedido de patente junto à Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica da Universidade Federal de Minas Gerais	86
Anexo 2: Certificados e premiações obtidos durante a realização do trabalho	104

1 - INTRODUÇÃO

O mundo vive hoje uma situação delicada: o enfrentamento de uma pandemia global que mudou a rotina de grande parcela da população. Tal fato abre uma fresta no que diz respeito a outras patologias graves, uma vez que há uma quebra na continuidade da preocupação com tais doenças, o que a longo prazo pode acarretar aumento significativo do número de casos.

A globalização e o avanço tecnológico presentes na sociedade moderna não impedem que antigos inimigos das civilizações continuem a causar danos. Dentre os problemas enfrentados desde tempos antigos, destacam-se as doenças negligenciadas, frequentes principalmente em países em desenvolvimento. E em meio a uma gama de doenças que prejudicam a população de modo ímpio, especialmente a mais pobre, as leishmanioses ocupam lugar de atenção.

As leishmanioses, conjunto de doenças amplamente distribuídas pelo mundo todo e que afetam milhões de pessoas, apresentam altas taxas de morbidade e de letalidade. O Brasil é o país do continente americano mais afetado por vários fatores: o fato de ser um país em desenvolvimento, ter grande parcela da população em áreas endêmicas e de risco, apresentar clima favorável ao desenvolvimento dos vetores, dentre outros. São doenças de notificação compulsória, sendo consideradas um grave problema de saúde pública pela sua magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica. Mesmo com todos os esforços já realizados para enfrentar a doença como um todo, novas alternativas são necessárias para que os casos sejam precocemente diagnosticados e tratados de forma rápida e oportuna, evitando-se complicações e óbitos (WHO, 2010; 2015; 2016).

Atualmente, o Brasil é responsável por 40% dos casos de leishmaniose tegumentar humana (LTH), sendo portanto um problema de saúde pública (ALVAR; VELEZ; BERN; HERRERO *et al.*, 2012). Grande parte dos casos poderiam ser evitados com medidas de prevenção e controle mais satisfatórias. Atualmente, as medidas que são adotadas têm por objetivo principal a interrupção do ciclo do parasito. Entretanto, dentre outros fatores, a variedade no número de parasitos associado com o ciclo silvestre que a doença possui dificultam em muito que medidas de controle sejam eficazes (TESH, 1995; WHO, 2010).

Os métodos atualmente utilizados no diagnóstico da LTH apresentam uma série de problemas no que diz respeito a sensibilidade e a especificidade. Em adição, a baixa de anticorpos circulantes em infecções assintomáticas e a presença de reações cruzadas com

outras patologias, especialmente as causadas por protozoários, são também fatores que podem dificultar a realização do diagnóstico correto (DAVIES; KAYE; CROFT; SUNDAR, 2003; GOMES; DE PAULA; DE MORAIS; SOARES *et al.*, 2014).

Diante dos fatos supracitados, o desenvolvimento de um teste que seja mais sensível, específico e que não apresente reações cruzadas faz-se necessário, visando a melhoria do diagnóstico dos pacientes positivos e contribuindo consideravelmente no controle da LTH. Para isso, trabalhos vêm sendo realizados pelo grupo utilizando métodos de imunoinformática e imunoproteômica, a fim de identificar novas proteínas candidatas ao diagnóstico sorológico da LTH (COSTA DUARTE; DOS REIS LAGE; LAGE; MESQUITA *et al.*, 2016; DUARTE; LAGE; LAGE; MARTINS *et al.*, 2016; MENEZES-SOUZA; DE OLIVEIRA MENDES; DE ARAUJO LEAO; DE SOUZA GOMES *et al.*, 2015; MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES MDE; BARTHOLOMEU *et al.*, 2015) e empregá-las como uma única proteína quimérica para uso no desenvolvimento de um teste diagnóstico de pacientes com LTH.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Etiologia e ciclo biológico do parasito *Leishmania (Viannia) braziliensis*

As leishmanioses são consideradas um conjunto de doenças causadas por parasitos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903a; b), sendo prevalentes em áreas tropicais e subtropicais e com mais de 20 espécies que causam a doença no homem. Dessas, pelo menos 14 espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, podem causar a Leishmaniose Tegumentar Humana (LTH) (LAINSON; SHAW, 1987; WHO, 2016). Atualmente, estima-se que a incidência anual da LTH seja de 0,7 a 1,2 milhões de casos (ALVAR; VELEZ; BERN; HERRERO *et al.*, 2012; WHO, 2016).

No Brasil e em outros países das Américas, há ocorrência de várias espécies do parasito que podem causar LTH. Dentre elas, podemos citar: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, porém a maioria dos casos no Brasil são atribuídos às espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* e principalmente *L. (V.) braziliensis*, baseado em achados parasitológicos e moleculares que o apontam como principal agente etiológico (DE ALMEIDA; VILHENA; BARRAL; BARRAL-NETTO, 2003; GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

O vetor responsável pela transmissão da doença ao homem no Brasil é o inseto do gênero *Lutzomyia* (GRIMALDI; TESH, 1993). A transmissão do patógeno ao inseto ocorre durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, onde além de sangue, o vetor ingere também formas amastigotas do parasito. No intestino do flebotomíneo, as amastigotas tornam-se promastigotas procíclicas, migram para o trato digestório anterior e se multiplicam, sendo então diferenciadas em promastigotas metacíclicas. Essas promastigotas metacíclicas migram novamente para as glândulas salivares do vetor, onde durante o repasto sanguíneo ocorrerá a inoculação na pele do hospedeiro vertebrado pelo flebotomíneo fêmea, dando continuidade ao ciclo (HANDLER; PATEL; KAPILA; AL-QUBATI *et al.*, 2015; KAYE; SCOTT, 2011; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012) (Figura 1).

No local da picada, há uma migração de células de defesa do mamífero, ocorrendo fagocitose do parasito pelas células do sistema fagocítico mononuclear. No interior dos macrófagos, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, havendo multiplicação do parasito nos fagolisossomas, no interior da célula por fissão binária, o que pode acarretar o rompimento do macrófago e, conseqüentemente, liberação dos parasitos que irão infectar

novas células, caracterizando a infecção do hospedeiro vertebrado. Além disso, a multiplicação do parasito também ocorre nos linfonodos e no fígado (BARKSKY; STORINO; SALGEA; KNAPP, 1978; REITHINGER; DUJARDIN; LOUZIR; PIRMEZ *et al.*, 2007).

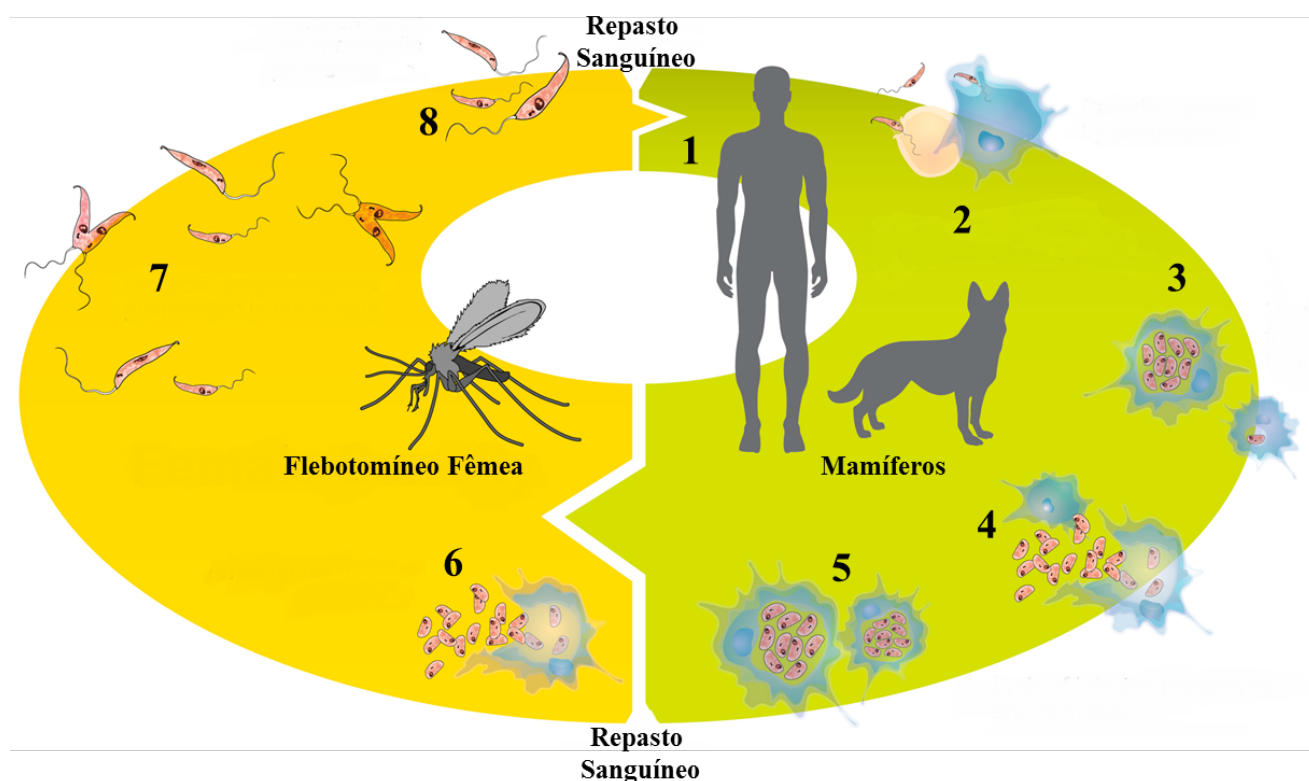


Figura 1: Ciclo biológico do parasito: (1) Fêmea do Flebotomíneo durante o repasto sanguíneo infecta o mamífero com promastigotas metacíclicas; (2) As promastigotas metacíclicas são fagocitadas no sítio de picada; (3) As promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas no interior das células de defesa do hospedeiro; (4) As amastigotas se multiplicam no interior do fagolisossomo, causando ruptura da célula do hospedeiro; (5) As amastigotas livres infectam novas células do sistema fagocítico mononuclear; (6) Células infectadas com amastigotas são ingeridas durante o repasto sanguíneo no indivíduo infectado e diferenciam-se em promastigotas procíclicas no intestino do flebotomíneo; (7) Promastigotas procíclicas se reproduzem no intestino do flebotomíneo; (8) Enfim, migram para as glândulas salivares do vetor, diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, que são infectivas, completando o ciclo. Adaptado de (VERAS; DE MENEZES, 2016).

2.2 – Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Humana

As leishmanioses apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontradas em cinco continentes e consideradas endêmicas em 98 países no mundo, além de apresentar a participação de diversos hospedeiros suscetíveis à infecção, como o homem e espécies de animais silvestres e domésticos, como o cão (DESJEUX, 2004). Estima-se que ocorra uma incidência anual no mundo de aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral humana (LVH) e de 0,7 a 1,3 milhões de casos de leishmaniose tegumentar humana (LTH) havendo elevada taxa morbidade e mortalidade (ALVAR; VELEZ; BERN;

HERRERO *et al.*, 2012; WHO, 2010; 2015; 2016). No Brasil, foram diagnosticados 17.119 casos de LTH em 2018, sendo que no estado de Minas Gerais foram registrados 1.451 novos casos de LTH, um aumento de 60% nos últimos 5 anos (SINAN, 2018).

O acometimento é majoritariamente associado a desnutrição, condições precárias de moradia, indivíduos com sistema imune debilitado e com dificuldade de recursos, sendo essas características de pessoas de situação econômica desfavorável (ASHFORD, 2000).

A figura 2 mostra o número de casos de LTH por UF no Brasil. Nota-se que Minas Gerais está entre os estados com maior número de casos.

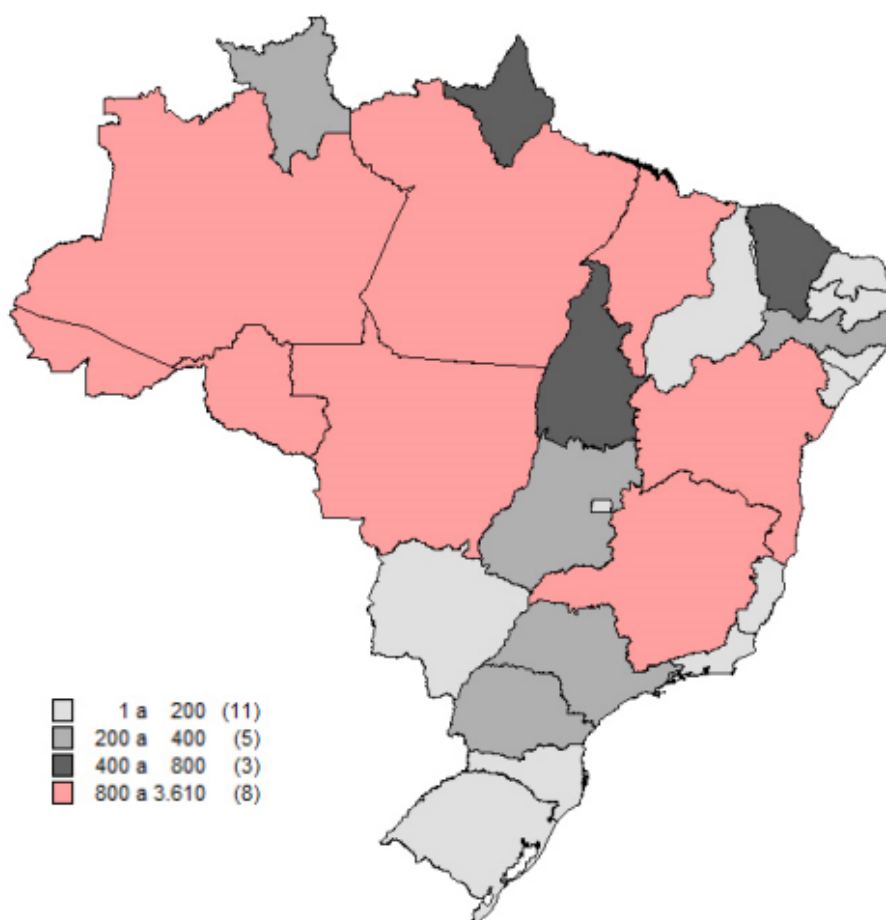


Figura 2: Casos de LTH no Brasil por UF no ano de 2015. Fonte: (SAÚDE, 2017).

2.3 – Manifestações clínicas da LTH

O hospedeiro vertebrado pode resistir à infecção, desenvolver uma forma assintomática da doença ou ainda apresentar a doença na forma tegumentar (KAYE; SCOTT, 2011). A doença tegumentar pode manifestar-se de três formas clínicas distintas. A forma clínica cutânea é caracterizada pela presença de lesões ulceradas na pele, que começam como um eritema que se desenvolve em uma pápula e nódulo que ulcera e apresenta bordas elevadas, usualmente no local da picada do flebotomíneo infectado, geralmente ocorrendo à

cura espontânea dependendo da resposta imune do hospedeiro, o que também garante proteção ao paciente (DESJEUX, 2001; REITHINGER; DUJARDIN; LOUZIR; PIRMEZ *et al.*, 2007). Em alguns casos, nódulos satélites são observados próximos à lesão inicial. É a forma clínica mais comumente encontrada, correspondendo a cerca de 90% dos casos, sendo comumente encontrada nas partes mais expostas do corpo, como pernas, braços e face. Quando curadas, as lesões dão lugar a cicatrizes, que podem inclusive levar o paciente a uma condição de morbidade (STEBUT, 2014).

A forma muco-cutânea ou mucosa é associada ao parasito *L. braziliensis*, sendo a mais grave forma da doença, podendo ser uma complicação da forma cutânea, devido a capacidade do parasito disseminar pela via hematogênica ou linfática. É caracterizada pela ocorrência de lesões que podem causar desfiguração devido à destruição parcial ou total da região naso-oro-faríngea. Essas lesões começam com inflamação nasal, seguido por ulceração da mucosa nasal e até queda de palato com perfuração septal, sendo de difícil tratamento e quase sempre fatal (MARSDEN, 1986; REITHINGER; DUJARDIN; LOUZIR; PIRMEZ *et al.*, 2007). A forma mucosa pode ainda ser subdividida em forma primária, onde a lesão de mucosa é causada pela picada do vetor diretamente na mucosa; forma indeterminada, onde não há identificação da porta de entrada e as lesões são oriundas de infecção sem manifestações clínicas cutâneas prévias; e ainda a forma tardia, onde o aparecimento da lesão mucosa ocorre tardiamente, geralmente anos após o aparecimento da lesão cutânea (CIMERMAN, 2010).

A forma cutâneo-difusa é associada ao parasito *L. amazonensis*, sendo caracterizada por causar lesões cutâneas nodulares distribuídas por todo o corpo, devido à metástase do parasito ou a partir de uma lesão inicial, porém com desenvolvimento rápido, de característica mais inflamatória, que dura em torno de dias ou semanas. Essa forma da doença tem sido mais comum na América do Sul e apresenta resposta ao tratamento, porém geralmente dura mais tempo (CARVALHO; BARRAL; COSTA; BITTENCOURT *et al.*, 1994; DESJEUX, 2004; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). É uma manifestação mais rara e grave, onde as lesões se apresentam como nódulos que raramente ulceram e que não apresentam cura espontânea. Por causa das recidivas frequentemente descritas nos pacientes, essa forma da doença configura um grave problema de saúde pública no Brasil. Em adição, as pessoas acometidas frequentemente apresentam lesões desfigurantes e incapacitantes, o que se torna um estigma social para o paciente, e causa de exclusão social (DESJEUX, 2004; GONTIJO, 2003).

2.4 – Medidas de prevenção, controle e tratamento da LTH

Ainda hoje, as medidas de controle das leishmanioses são desafiadoras. Elas visam principalmente reduzir a morbidade causada pela presença de feridas desfigurantes nas formas mais graves da LTH, e, em alguns casos também a mortalidade. Essas medidas incluem notificação de novos casos, garantia a diagnóstico, tratamento e monitoramento de casos ativos e investigação dos focos de transmissão. Todavia, o caráter zoonótico da patologia, bem como a manutenção do ciclo silvestre dificultam o controle da doença (FRANKE; WIGNALL; CRUZ; ROSALES *et al.*, 1990; TESH, 1995). Outras medidas preventivas como uso de coleiras impregnadas com inseticidas nos cães domésticos e controle do microambiente peridomiciliar envolvem não somente a consciência coletiva, mas questões socioeconômicas (ALEXANDER; MAROLI, 2003; BANETH; KOUTINAS; SOLANO-GALLEGO; BOURDEAU *et al.*, 2008; COURA-VITAL; MARQUES; VELOSO; REIS *et al.*, 2011).

O tratamento clínico das leishmanioses consiste primariamente no uso de antimoniais pentavalentes, sendo aplicados preferencialmente em vias intra-muscular ou endovenosa (GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L., 2010). Possui como desvantagens o aparecimento de efeitos colaterais graves (TUON; AMATO; GRAF; SIQUEIRA *et al.*, 2008). além do aumento da resistência dos parasitos à droga já serem reportados em diversas regiões do mundo (GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L., 2010). A Anfotericina B é utilizada em casos onde há falha no tratamento com os antimoniais pentavalentes, sendo também reportados casos de elevada toxicidade (SERENO; HOLZMULLER; LEMESRE, 2000). A pentamidina, medicamento usado em alguns lugares do mundo no tratamento da leishmaniose tegumentar, manifestações cutânea e mucosa é considerado como um fármaco de segunda escolha e usado quando há impossibilidade ou falha no uso dos antimoniais. Porém, também apresenta efeitos adversos (CIMERMAN, 2010; NAGLE; KHARE; KUMAR; SUPEK *et al.*, 2014).

No que diz respeito a medicamentos, há uma necessidade de descoberta de novos fármacos que sejam efetivos, menos tóxicos e acessíveis ao paciente que necessita do tratamento das diversas formas de leishmaniose, uma vez que os fármacos hoje conhecidos e utilizados apresentam problemas com toxicidade, eficácia e duração do tratamento, o que consequentemente causa em alguns casos baixa adesão por parte dos pacientes (DESJEUX, 2004; EGGER; MEIER; LEU; CHRISTEN *et al.*, 2010).

2.5 - Diagnóstico da LTH

O diagnóstico das leishmanioses pode ser um fator complicante, uma vez que a doença abrange um espectro variado de manifestações clínicas e os sintomas podem ser semelhantes com os de outras doenças, como úlceras, hanseníase e câncer (CHAPPUIS; SUNDAR; HAILU; GHALIB *et al.*, 2007b; SINGH, 2006). Nesse sentido, o diagnóstico é realizado com base na avaliação de parâmetros clínicos, inquéritos epidemiológicos e na confirmação por exames laboratoriais disponíveis. Ao deparar-se com um paciente suspeito, a confirmação deve ser via pesquisa direta do parasito, seja por identificação de amastigotas em tecido, de promastigotas em culturas, ou ainda de seus produtos, como pesquisa de anticorpos via aglutinação, imunofluorescência indireta e ELISA. Se confirmado, inicia-se investigação epidemiológica e tratamento preconizado, devendo o paciente ser acompanhado mensalmente durante três meses (GONTIJO, 2003; TESH, 1995).

2.5.1 - Métodos de Diagnóstico Clínico-Epidemiológico

Com a descontinuação do teste intradermorreação de Montenegro, o diagnóstico clínico é hoje, baseado em observação das manifestações clínicas da doença. O teste consistia na observação da resposta modulada por células T de memória que tiveram contato previamente com o parasito. O método possui como desvantagens a baixa sensibilidade e especificidade (DE PAIVA-CAVALCANTI; DE MORAIS; PESSOA-E-SILVA; TRAJANO-SILVA *et al.*, 2015; WEIGLE; SARAVIA, 1996).

Usualmente, o paciente oriundo de áreas endêmicas tem o diagnóstico fechado ao apresentar lesão característica da LTH, caracterizada pela presença de úlcera com bordas elevadas, edemaciada e de fundo granulomatoso, resposta positiva ao tratamento, caracterizando um diagnóstico terapêutico e diagnóstico diferencial de outras patologias de sintomas clínicos semelhantes, como hanseníase, câncer de pele, tuberculose e infecções fúngicas de pele. O conjunto de sinais clínicos da LTH faz com que o diagnóstico de novos casos, e até de casos mais antigos, seja de difícil conclusão (ESCOBAR; MARTINEZ; SMITH; PALMA, 1992; REITHINGER; DUJARDIN; LOUZIR; PIRMEZ *et al.*, 2007; RIDLEY; RIDLEY, 1983).

A tabela 1 compara resultados de sensibilidade e especificidade obtidos na IDRM por diferentes autores.

Tabela 1: Valores de sensibilidade e especificidade obtidos no teste de IDRM por diferentes autores

Teste diagnóstico	Se (%)	Sp (%)	Autor
IDRM	84,3	100	(BOGGILD; MIRANDA-VERASTEGUI; ESPINOSA; AREVALO <i>et al.</i> , 2007)
IDRM em pacientes com lesão aguda	75,0	78,6	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
IDRM em pacientes com lesão subaguda	78,3	83,3	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
IDRM em pacientes com lesão crônica	93,3	75,0	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
IDRM em pacientes com lesão ulcerativa	79,8	80,0	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
IDRM em pacientes com lesão não-ulcerativa	71,4	50,0	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Intradermorreação de Montenegro (pápula de 5mm)	97,4	93,9	(SKRABA; DE MELLO; PEDROSO; FERREIRA <i>et al.</i> , 2015)
Intradermorreação de Montenegro (pápula de 6mm)	95,8	97,1	(SKRABA; DE MELLO; PEDROSO; FERREIRA <i>et al.</i> , 2015)

Se: Sensibilidade; Sp: Especificidade

2.5.2 - Diagnóstico Laboratorial por Métodos Diretos

O diagnóstico parasitológico é altamente específico, pois baseia-se na visualização de formas amastigotas em lâminas de microscopia, demonstrando a presença do parasito em materiais de biópsia, portanto não deixando dúvidas sobre a positividade do paciente. Por isso, continua sendo o padrão ouro, porém com sensibilidade de até 88%, visto que há limitações quando a carga parasitária é baixa (GOTO, H.; LINDOSO, J. A., 2010; SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. *et al.*, 2017). O diagnóstico parasitológico é também possível de ser realizado por meio da detecção do DNA do parasito por PCR, que pode ter uma especificidade de 100%, sensibilidade variando de 20-70% e acurácia de 86%. Porém, há limitações no que diz respeito a custo e aplicação do teste em uma grande parcela da população, além de necessitar de um material coletado de qualidade (DE PAIVA-CAVALCANTI; DE MORAIS; PESSOA-E-SILVA; TRAJANO-SILVA *et al.*, 2015; SRIVASTAVA, 2010; SUNDAR; RAI, 2002).

Há ainda a possibilidade de inoculação de biópsias em meio de cultura, porém a sensibilidade destes testes não é satisfatória, falhando muitas vezes em detectar a presença da infecção (ANTHONY; GROGL; SACCI; BALLOU, 1987; BARRAL; ALMEIDA; DE JESUS; MEDEIROS NETO *et al.*, 1987; GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L., 2010; LUNEDO;

THOMAZ-SOCCOL; DE CASTRO; TELLES, 2012; REITHINGER; DUJARDIN; LOUZIR; PIRMEZ *et al.*, 2007; SCHUBACH; CUZZI-MAYA; OLIVEIRA; SARTORI *et al.*, 2001; WEIGLE; DEDAVALOS; HEREDIA; MOLINEROS *et al.*, 1987; WEIGLE; LABRADA; LOZANO; SANTRICH *et al.*, 2002).

O diagnóstico parasitológico é conclusivo quando comparado aos demais testes, uma vez que a identificação do parasito não deixa dúvidas sobre a presença do mesmo. Porém, apesar da elevada especificidade, há limitações em sua sensibilidade, devido à distribuição do parasito não ser homogênea nos tecidos, ou quando a infecção possui baixa carga parasitária. Além disso, a leitura da lâmina exige treinamento adequado e a coleta das amostras é considerada invasiva, fatos que dificultam sua utilização na prática médica rotineira (BARRAL; ALMEIDA; DE JESUS; MEDEIROS NETO *et al.*, 1987; GOMES; CESETTI; DE PAULA; VERNAL *et al.*, 2017; REITHINGER; DUJARDIN; LOUZIR; PIRMEZ *et al.*, 2007; TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N., 2003; WEIGLE; DEDAVALOS; HEREDIA; MOLINEROS *et al.*, 1987).

A tabela 2 apresenta dados de sensibilidade e especificidade obtidos por meio diferentes testes diagnósticos diretos em diferentes trabalhos.

Tabela 2: Valores de sensibilidade e especificidade obtidos em testes diretos por diferentes autores

Teste diagnóstico	Se (%)	Sp (%)	Autor
Cultura do Parasito	62,8	100	(BENSOUSSAN; NASEREDDIN; JONAS; SCHNUR <i>et al.</i> , 2006)
Cultura do parasito em meio RPMI	35,8	100	(BOGGILD; MIRANDA-VERASTEGUI; ESPINOSA; AREVALO <i>et al.</i> , 2007)
Cultura do parasito em meio Novy-MacNeal-Nicolle	54,7	100	(BOGGILD; MIRANDA-VERASTEGUI; ESPINOSA; AREVALO <i>et al.</i> , 2007)
Cultura do parasito de lesão aguda em meio Novy-MacNeal-Nicolle	68,3	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Cultura do parasito de lesão sub-aguda em meio Novy-MacNeal-Nicolle	50,0	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Cultura do parasito de lesão crônica em meio Novy-MacNeal-Nicolle	24,0	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Cultura do parasito de lesão ulcerativa em meio Novy-MacNeal-Nicolle	62,9	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Cultura do parasito de lesão não-ulcerativa em meio Novy-MacNeal-Nicolle	34,5	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)

Microcultura do Parasito	71,7	100	(BOGGILD; MIRANDA-VERASTEGUI; ESPINOSA; AREVALO <i>et al.</i> , 2007)
Microcultura do Parasito de lesões agudas em meio RPMI	79,8	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Microcultura do Parasito de lesões subagudas em meio RPMI	71,9	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Microcultura do Parasito de lesões crônicas em meio RPMI	80,0	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Microcultura do Parasito de lesões ulcerativas em meio RPMI	79,5	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Microcultura do Parasito de lesões não-ulcerativas em meio RPMI	72,4	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Esfregação de lesão	74,4	100	(BENSOUSSAN; NASEREDDIN; JONAS; SCHNUR <i>et al.</i> , 2006)
Esfregação de lesão	84,9	100	(BOGGILD; MIRANDA-VERASTEGUI; ESPINOSA; AREVALO <i>et al.</i> , 2007)
Esfregação de lesões agudas	78,8	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Esfregação de lesões subagudas	68,8	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Esfregação de lesões crônicas	44,0	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Esfregação de lesões ulcerativas	72,7	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
Esfregação de lesões não-ulcerativas	65,5	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
PCR de Espaçador interno transcrito do rRNA de lesão	91,0	100	(BENSOUSSAN; NASEREDDIN; JONAS; SCHNUR <i>et al.</i> , 2006)
PCR de splice-ladder mini-exon do rRNA de lesão	53,8	100	(BENSOUSSAN; NASEREDDIN; JONAS; SCHNUR <i>et al.</i> , 2006)
PCR de K-DNA de lesão	98,7	57,1	(BENSOUSSAN; NASEREDDIN; JONAS; SCHNUR <i>et al.</i> , 2006)
PCR de K-DNA de lesão	94,3	22,2	(BOGGILD; MIRANDA-VERASTEGUI; ESPINOSA; AREVALO <i>et al.</i> , 2007)
PCR de K-DNA de aspirados e raspados de lesão aguda	99,0	65,0	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
PCR de K-DNA de aspirados e raspados de lesão subaguda	96,9	70,0	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
PCR de K-DNA de aspirados e raspados de lesão crônica	88,0	75,0	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)

PCR de K-DNA de aspirados e raspados de lesão ulcerativa	97,7	63,2	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
PCR de K-DNA de aspirados e raspados de lesão não-ulcerativa	93,2	100	(BOGGILD; RAMOS; ESPINOSA; VALENCIA <i>et al.</i> , 2010)
PCR Real Time de biópsia utilizando CYBR green	73,81	100	(GOMES; CESETTI; DE PAULA; VERNAL <i>et al.</i> , 2017)
PCR Real Time de Swab utilizando CYBR green	75,0	100	(GOMES; CESETTI; DE PAULA; VERNAL <i>et al.</i> , 2017)
PCR Real Time de Biópsia utilizando TaqMan	54,76	100	(GOMES; CESETTI; DE PAULA; VERNAL <i>et al.</i> , 2017)
PCR Real Time de Swab utilizando TaqMan	56,25	100	(GOMES; CESETTI; DE PAULA; VERNAL <i>et al.</i> , 2017)
Se: Sensibilidade; Sp: Especificidade			

2.5.3 - Diagnóstico Laboratorial por Métodos Indiretos

Os testes sorológicos têm sido utilizados no diagnóstico de diversas doenças, por serem considerados de fácil execução, baixo custo e não necessitarem de infraestrutura laboratorial complexa e equipamentos de custo elevado (MABEY; PEELING; USTIANOWSKI; PERKINS, 2004). Testes sorológicos, tais como o ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio de imunofluorescência indireta (IFI), teste de aglutinação direta (DAT) e Western-blot, se baseiam na detecção de anticorpos específicos para antígenos do agente etiológico em amostras de soro dos pacientes, sendo também utilizados no diagnóstico das leishmanioses (DE PAIVA-CAVALCANTI; DE MORAIS; PESSOA; TRAJANO-SILVA *et al.*, 2015; TAVARES, C. A.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N., 2003). Os valores de sensibilidade e especificidade para os testes de ELISA são muito variáveis, dependendo do antígeno utilizado na adsorção da placa, podendo variar de 66,9 a 93,9 (GUIMARAES, M. C.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L., 1990; SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. *et al.*, 2017). Para a imunofluorescência indireta, os valores de sensibilidade e especificidade são de 75,4 e 89,2%, respectivamente (BARROSO-FREITAS; PASSOS; MOUTA-CONFORT; MADEIRA *et al.*, 2009; DE PAIVA-CAVALCANTI; DE MORAIS; PESSOA; TRAJANO-SILVA *et al.*, 2015). A aglutinação indireta apresenta valores de sensibilidade e especificidade de 88.6 e 96.7%, respectivamente (SCHALLIG; SCHOONE; BEIJER; KROON *et al.*, 2002). O Western-blot não é um teste disponível comercialmente para diagnóstico das leishmanioses, sendo seu uso restrito a pesquisa. Seus valores de sensibilidade e especificidade em testes feitos com extrato bruto do parasito variaram

respectivamente de 65,1 a 57,5% (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. *et al.*, 2015). Por apresentarem grandes variações em sua sensibilidade e/ou especificidade, não são considerados como padrão ouro, e frequentemente devem ser associados a outros métodos de detecção da doença para que o diagnóstico seja fechado corretamente (DE PAIVA-CAVALCANTI; DE MORAIS; PESSOA; TRAJANO-SILVA *et al.*, 2015; TAVARES, C. A.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N., 2003).

O ensaio imunoenzimático (ELISA), é uma importante ferramenta para o diagnóstico da LTH e monitoramento da exposição dos indivíduos em áreas endêmicas. É sabido que pacientes com leishmaniose cutânea possuem baixa produção de anticorpos específicos aos parasitos, o que prejudica a sensibilidade dos testes laboratoriais que são utilizados (GOTO, H.; LINDOSO, J. A., 2010). Também, indivíduos com a forma muco-cutânea, que é caracterizada pela destruição tecidual e desfigurante nos pacientes, podem não ser tratados da maneira mais adequada, devido a limitações do diagnóstico (GOMES; PAULA; MORAIS; SOARES *et al.*, 2014). Tais fatores acabam por influenciar a eficácia terapêutica da LTH no Brasil (GOTO, H.; LINDOSO, J. A., 2010). Em adição, alguns antígenos utilizados no sorodiagnóstico da LTH podem ser reconhecidos por anticorpos presentes nos soros de pacientes com outras enfermidades, como doença de Chagas, malária, tuberculose, hanseníase e esquistossomose, causando reação cruzada nos ensaios e comprometendo a eficácia dos testes (CATALDO; DE QUEIROZ MELLO; MOUTA-CONFORT; DE FATIMA MADEIRA *et al.*, 2010; GOMES-SILVA; SOUZA; AFONSO-CARDOSO; ANDRADE; DIETZE; LEMOS; BELLI; FAVORETO JUNIOR *et al.*, 2008; KALTER, 1994; VEXENAT ADE; SANTANA; TEIXEIRA, 1996).

Até o momento, nenhum dos testes de diagnóstico disponível se apresentou totalmente eficaz, ocorrendo diferenças na sensibilidade e/ou especificidade dos mesmos, o que torna necessário um conhecimento epidemiológico e clínico para o diagnóstico final (GOMES; DE PAULA; CESETTI; ROSELINO *et al.*, 2014). Neste sentido, a identificação de novos alvos é considerada uma etapa importante na descoberta de antígenos para o desenvolvimento de testes, já que a variação da eficácia tem sido atribuída, em grande parte, por inadequada seleção de alvos (MASUDA; DO NASCIMENTO; GUERRA; PARANHOS GDA *et al.*, 1989; SARAVIA; VALDERRAMA; LABRADA; HOLGUIN *et al.*, 1989; SINGH, 2006). O diagnóstico sorológico utilizando-se antígenos recombinantes é uma realidade, tendo sido implantado na rotina laboratorial. Em contrapartida, o diagnóstico da LTH ainda levanta dúvidas, não havendo unanimidade entre qual o melhor antígeno e/ou teste a ser utilizado. Um teste sorológico sensível e específico seria de grande valia para diagnóstico da LTH, uma vez

que auxiliaria na condução do paciente ao correto tratamento (CUNNINGHAM; HASKER; DAS; EL SAFI *et al.*, 2012; SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. *et al.*, 2017).

É observada uma baixa de anticorpos específicos anti-leishmania em pacientes com leishmaniose tegumentar, fato que muitas vezes dificulta o diagnóstico sorológico da doença. Já em pacientes com a forma mucosa, níveis mais elevados de anticorpos são observados, devido ao decurso longo da doença (MASUDA; DO NASCIMENTO; GUERRA; PARANHOS GDA *et al.*, 1989; SARAVIA; VALDERRAMA; LABRADA; HOLGUIN *et al.*, 1989).

A tabela 3 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade obtidos em diferentes testes indiretos por vários autores.

Tabela 3: Valores de sensibilidade e especificidade obtidos em testes indiretos por diferentes autores

Teste diagnóstico	Se (%)	Sp (%)	Autor
Imunofluorescência (IgA)	3,1	100	(GUIMARAES, M. C. S.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L., 1990)
Imunofluorescência (IgM)	20,5	87,8	(GUIMARAES, M. C. S.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L., 1990)
Imunofluorescência (IgG)	27,7	71,4	(GUIMARAES, M. C. S.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L., 1990)
Imunofluorescência (IgG) em pacientes com LTH	88,4	56,7	(ROCHA; GONTIJO; ELOI-SANTOS; TEIXEIRA-CARVALHO <i>et al.</i> , 2006)
Imunofluorescência (IgG) em população co-infectada	88,4	43,7	(ROCHA; GONTIJO; ELOI-SANTOS; TEIXEIRA-CARVALHO <i>et al.</i> , 2006)
ELISA (IgM)	56,6	72,9	(GUIMARAES, M. C. S.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L., 1990)
ELISA (IgG)	66,9	77,5	(GUIMARAES, M. C. S.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L., 1990)
ELISA com extrato do parasito preparado em tampão Concanavalina-A	91,0	57,0	(GOMES-SILVA; SOUZA; AFONSO-CARDOSO; ANDRADE; DIETZE; LEMOS; BELLI; FAVORETO <i>et al.</i> , 2008)
ELISA com extrato do parasito preparado em tampão Jacalina	95,0	56,0	(GOMES-SILVA; SOUZA; AFONSO-CARDOSO; ANDRADE; DIETZE; LEMOS; BELLI; FAVORETO <i>et al.</i> , 2008)
ELISA com fração não ligada a tampão Concanavalina-A	91,0	53,0	(GOMES-SILVA; SOUZA; AFONSO-CARDOSO; ANDRADE; DIETZE; LEMOS; BELLI; FAVORETO <i>et al.</i> , 2008)
ELISA com fração não ligada a tampão Jacalina	91,0	56,0	(GOMES-SILVA; SOUZA; AFONSO-CARDOSO; ANDRADE; DIETZE; LEMOS; BELLI; FAVORETO <i>et al.</i> , 2008)

ELISA com fração ligada a tampão Concanavalina-A	81,0	58,0	(GOMES-SILVA; SOUZA; AFONSO-CARDOSO; ANDRADE; DIETZE; LEMOS; BELLI; FAVORETO et al., 2008)
ELISA com fração ligada a tampão Jacalina	60,0	66,0	(GOMES-SILVA; SOUZA; AFONSO-CARDOSO; ANDRADE; DIETZE; LEMOS; BELLI; FAVORETO et al., 2008)
ELISA com extrato solúvel do parasito	67,3	91,4	(SOUZA; SOTO; COSTA; BOAVENTURA et al., 2013)
ELISA com proteína recombinante r-HSP70	65,0	92,0	(SOUZA; SOTO; COSTA; BOAVENTURA et al., 2013)
ELISA com proteína recombinante r-H2A	65,7	71,5	(SOUZA; SOTO; COSTA; BOAVENTURA et al., 2013)
ELISA com proteína recombinante r-H2B	41,2	79,5	(SOUZA; SOTO; COSTA; BOAVENTURA et al., 2013)
ELISA com proteína recombinante r-H3	39,8	71,5	(SOUZA; SOTO; COSTA; BOAVENTURA et al., 2013)
ELISA com proteína recombinante r-H4	52,5	71,5	(SOUZA; SOTO; COSTA; BOAVENTURA et al., 2013)
ELISA com proteína recombinante r-KMP11	71,7	53,4	(SOUZA; SOTO; COSTA; BOAVENTURA et al., 2013)
ELISA com proteína recombinante r-Peroxidocin	98,46	100	(MENEZES-SOUZA; MENDES; NAGEM; SANTOS et al., 2014)
ELISA com antígenos de membrana	93,3	90,8	(SKRABA; PEDROSO; FIORINI; ROSADO et al., 2014)
ELISA com extrato solúvel do parasito	70,77	68,57	(MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; REIS-CUNHA et al., 2014)
ELISA com peptídeo 1	63,08	94,29	(MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; REIS-CUNHA et al., 2014)
ELISA com peptídeo 2	63,08	90,00	(MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; REIS-CUNHA et al., 2014)
ELISA com peptídeo 3	89,23	91,43	(MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; REIS-CUNHA et al., 2014)
ELISA com proteína recombinante r-HSP83.1	93,85	95,71	(MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; REIS-CUNHA et al., 2014)
ELISA com extrato solúvel do parasito	70,77	68,57	(MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; BARTHOLOMEU et al., 2015)
ELISA com Peptídeo sintético	96,92	91,43	(MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; BARTHOLOMEU et al., 2015)
ELISA com proteína recombinante r-CatL	96,92	95,71	(MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; BARTHOLOMEU et al., 2015)
ELISA com extrato solúvel do parasito	65,1	57,5	(DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. et al., 2015)
ELISA com proteína recombinante r- β -tubulin	100	82,5	(DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.;

ELISA com proteína recombinante r-Proteína hipotética	95,4	85,0	MAGALHAES, R. D. M. et al., 2015)
ELISA com proteína recombinante r-Tryparedoxin Peroxidase	100	100	(DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. et al., 2015)
ELISA com proteína recombinante r-Eukariotic initiation factor 5a	100	92,5	(DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. et al., 2015)
ELISA com proteína recombinante r-Enolase	100	85,0	(DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. et al., 2015)
ELISA com proteína recombinante r-Lb6H	100	98,5	(SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C. A.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. et al., 2017)
ELISA com proteína recombinante r-Lb8E	83,3	83,3	(SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C. A.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. et al., 2017)
ELISA (IgG) com extrato solúvel do parasito	100%	0	(PEDRAL-SAMPAIO; ALVES; SCHRIEFER; MAGALHAES et al., 2016)
ELISA com proteína recombinante r-LB8E	83,3	83,3	(SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C. A.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. et al., 2017)
ELISA com proteína recombinante r-LB6H	100,0	98,5	(SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C. A.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. et al., 2017)
ELISA com extrato de L. major	91,2	95,6	(SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C. A.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. et al., 2017)
ELISA com extrato solúvel do parasito	94,4	90,9	(BIVONA; CZENTNER; ALBERTI; CERNY et al., 2019)
ELISA com extrato solúvel do parasito	70,0	100,0	(DE SOUZA; CARVALHO; BATES; PETTERLE et al., 2019)
ELISA com proteína recombinante r-LBK39	88	98	(DE SOUZA; CARVALHO; BATES; PETTERLE et al., 2019)
ELISA proteína recombinante r-F-CPB	90,7	95,5	(BIVONA; CZENTNER; ALBERTI; CERNY et al., 2019)
ELISA proteína recombinante r-N-CPB	94,4	90,9	(BIVONA; CZENTNER; ALBERTI; CERNY et al., 2019)
ELISA proteína recombinante r-C-CPB	94,3	91,3	(BIVONA; CZENTNER; ALBERTI; CERNY et al., 2019)
Citometria em pacientes com LTH	93,6	87,6	(ROCHA; GONTIJO; ELOI-SANTOS; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2006)
Citometria em população co-infectada	93,6	64,0	(ROCHA; GONTIJO; ELOI-SANTOS; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2006)
Citometria de fluxo com antígeno vivo	86,0	78,0	(PEREIRA; REIS; SOUZA; DE OLIVEIRA et al., 2012)
Citometria com antígeno	90,0	78,0	(PEREIRA; REIS; SOUZA; DE

fixado			OLIVEIRA et al., 2012)
Citometria de Fluxo	100	0	(PEDRAL-SAMPAIO; ALVES; SCHRIEFER; MAGALHAES et al., 2016)

Se: Sensibilidade; Sp: Especificidade

2.6 – O papel das proteínas selecionadas na composição da proteína quimérica

As proteínas têm um papel fundamental na antigenicidade e imunogenicidade de um microrganismo sobre o sistema imune de um hospedeiro. A possibilidade de mapeamento de tais proteínas por meio de imunoinformática permite uma avaliação prévia no que diz respeito à capacidade de reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, sendo possível então a criação de métodos diagnósticos que utilizem tais proteínas (MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; BARTHOLOMEU et al., 2015; SOUZA; SOTO; COSTA; BOAVENTURA et al., 2013).

Actin ou Actina é uma proteína comum e bastante presente em eucaritos, incluindo também os parasitos *Leishmania* sp. Sua importância na formação do citoesqueleto, conformação celular e na interação com outras proteínas já foi descrita, tendo inclusive propriedades similares à tubulina e ligadas à motilidade e transporte intracelular (BUGYI; CARLIER, 2010; DOS REMEDIOS; CHHABRA; KEKIC; DEDOVA et al., 2003; KUMAR; SRIVASTAVA; MITRA; SAHASRABUDDHE et al., 2012). Estudos prévios demonstram que a actina presente em parasitos da ordem kinetoplastida estão localizadas no citoesqueleto cortical, flagelo, núcleo e cinetoplasto e que a estrutura e a funcionalidade dessa proteína seja diferente quando comparada a outros eucariotos (SAHASRABUDDHE; BAJPAI; GUPTA, 2004). A presença de anticorpos anti-tubulina em soros de hospedeiros já foi demonstrada, havendo reconhecimento da proteína pelo sistema imune de pacientes com leishmaniose (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. et al., 2015; PATERAKI; PORTOCALA; LABROUSSE; GUESDON, 1983).

Pouco é descrito sobre a *Paraflagelar ROD protein ID*, e seu papel nas leishmanioses. Sabe-se que se trata de uma proteína altamente expressa no flagelo de parasitos, incluindo os da ordem *Kinetoplastida*, dos quais é ubiqüitária, estando presente ao longo de todo o axonema. É importante na motilidade do parasito, garantindo velocidade e portanto mais abundante em formas promastigotas, porém é conservada na forma amastigota (CACHON; CACHON; COSSON; COSSON, 1988; MOORE; SANTRICH; LEBOWITZ, 1996; SANTRICH; MOORE; SHERWIN; BASTIN et al., 1997). Sabe-se ainda que a *Paraflagelar*

ROD protein tem um importante papel na imunogenicidade contra infecções por *Leishmania* spp. (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. *et al.*, 2015; PORTMAN; GULL, 2010).

As *Tubulin* ou Tubulinas incluem uma família de proteínas que são responsáveis por várias funções no microrganismo, como por exemplo citoesqueleto em microorganismos procariotos e divisão celular. Embora a grande quantidade de subtipos de tubulinas não tenha suas funções completamente descritas, é sabido que as alfa e beta tubulinas são especificamente responsáveis pela estrutura microtubular dos microrganismos e arquitetura da célula, bem como sua função. As tubulinas são importantes para as diversas espécies de *Leishmania*, uma vez que há um arranjo de microtubos perto da membrana celular, sendo majoritariamente encontradas na porção de proteínas do citoesqueleto (HUANG; ROBERTS; PRATT; DAVID *et al.*, 1984; MATRANGOLO; LIARTE; ANDRADE; DE MELO *et al.*, 2013; MCKEAN; VAUGHAN; GULL, 2001).

Eukariotic Initiation Factor 5A, foi primeiramente descrita como uma proteína que induz a resposta protetora, ou seja, do tipo Th1 em indivíduos com leishmaniose. É uma proteína essencial, necessária para a proliferação celular. Já foi descrita como um potencial antígeno para reconhecimento de indivíduos infectados com *Leishmania*, sendo presente nas formas amastigotas e promastigotas do parasito e por conseguinte considerado como uma boa candidata a ser avaliada em testes diagnósticos, como imunógeno em vacinas e até mesmo como uma molécula para tratamento de indivíduos infectados com leishmaniose (COELHO; OLIVEIRA; VALADARES; CHAVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2012; DUARTE; LAGE; MARTINS; COSTA *et al.*, 2017; KOUTSONI; BARHOUMI; GUIZANI; DOTSIKA, 2014; SKEIKY; GUDERIAN; BENSON; BACELAR *et al.*, 1995).

Proteínas *MORN* (*Membrane Orientation and Recognition Nexus*) são proteínas essencialmente presentes e com diversas funções em uma grande variedade de organismos, tendo função enzimática e de interação entre proteínas e citoesqueleto, bem como na função mitótica. Nos parasitos do gênero *Leishmania*, a função das proteínas *MORN* não estão bem estabelecidas, porém sabe-se que são importantes candidatos a testes diagnósticos para as leishmanioses (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. *et al.*, 2015; GUBBELS; VAISHNAVA; BOOT; DUBREMETZ *et al.*, 2006).

A *Translation elongation factor 1-Beta*, trata-se de uma proteína secretada e é conhecida por participar, além de outros processos celulares, da síntese de proteínas e sobrevivência de amastigotas em macrófagos, bem como sua persistência e aparecimento de

doença metastática. Trabalhos prévios já identificaram o potencial da proteína em agir como antígeno em testes diagnósticos para a LTH (GUBBELS; VAISHNAVA; BOOT; DUBREMETZ *et al.*, 2006) (CUERVO; DE JESUS; SABOIA-VAHIA; MENDONÇA-LIMA *et al.*, 2009; DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. *et al.*, 2015; WALKER; ACESTOR; GONGORA; QUADRONI *et al.*, 2006).

Heat shock proteins (HSPs) são por sua vez moléculas de atenção por serem considerados potentes antígenos que induzem a uma resposta imune. São conservadas em microrganismos procarióticos e eucarióticos, tendo diversas funções importantes no dobramento, montagem e translocação de proteínas. Além de controle da maturação, ativação, translocação e degradação, e manutenção da homeostase, uma vez que funcionam como chaperonas moleculares interagindo com outras proteínas e assim impedindo a ligação inapropriada com outras proteínas, elas tem um papel importante na resposta ao estresse por exemplo ao calor (FEDER; HOFMANN, 1999; HENDERSON, 2010). Em adição a isso, as sequências gênicas das HSPs são altamente conservadas mesmo após a evolução do parasito, tendo se tornado um sinalizador para o hospedeiro de que há presença de infecção. (KAUFMANN, 1990). Trabalhos recentes têm demonstrado o potencial das HSPs de atuarem como antígeno no diagnóstico sorológico das leishmanioses (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. *et al.*, 2015; MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES; REIS-CUNHA *et al.*, 2014).

A proteína *tryparedoxyn peroxidase* pertence a uma família de proteínas chamada peroxiredoxinas, sendo associadas à virulência do parasito e possuindo alta antigenicidade durante a doença ativa. Estudos tem demonstrado o potencial da *tryparedoxyn peroxidase* no diagnóstico da leishmaniose tegumentar (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. *et al.*, 2015).

A proteína *Cytochrome oxidase* é uma proteína de papel importante tanto nas formas amastigotas como nas promastigotas. Já é descrita por ter função na fosforilação oxidativa e a sobrevivência do parasito intracelular. Tem também importância na morte do parasito frente ao uso de drogas leishmanicidas (DEY; MENESES; SALOTRA; KAMHAWI *et al.*, 2010; LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007).

2.7 – Novas tecnologias com potencial aplicabilidade no diagnóstico da LTH

A descoberta de novos alvos deve satisfazer a uma variedade de critérios para permitir a progressão do desenvolvimento de novos métodos diagnósticos. Para o diagnóstico sorológico, fatores importantes incluem: identificar por meio de imunoinformática epítomos de linfócitos B das proteínas alvo; avaliar a homologia desses epítomos com proteínas ortólogas do hospedeiro e de outros microrganismos associado à reatividade cruzada em ensaios sorológicos; além da etapa de validação experimental (CHAPPUIS; SUNDAR; HAILU; GHALIB *et al.*, 2007a; ESCOBAR; MARTINEZ; SMITH; PALMA, 1992; GONTIJO, 2003; TESH, 1995).

A fim de minimizar problemas de sensibilidade e/ou especificidade, vários trabalhos têm sido realizados para identificar novos antígenos candidatos ao diagnóstico sorológico da LTH, razão pela qual há um grande interesse na descoberta e caracterização de moléculas antigênicas que possam ser utilizadas nos supracitados testes sorológicos diagnósticos (CATALDO; DE QUEIROZ MELLO; MOUTA-CONFORT; DE FATIMA MADEIRA *et al.*, 2010; DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. *et al.*, 2015; MENEZES-SOUZA; DE OLIVEIRA MENDES; DE ARAUJO LEAO; DE SOUZA GOMES *et al.*, 2015; MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES MDE; BARTHOLOMEU *et al.*, 2015; SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. *et al.*, 2017). Baseado nas informações obtidas pelo sequenciamento dos genomas, as abordagens experimentais associando dados de imunoproteômica com dados de predição *in silico* por imunoinformática, baseado em genomas publicados, permitem a busca por proteínas antigênicas, assim como determinar as regiões desses alvos que estabelecem a antigenicidade e especificidade para o reconhecimento dos alvos pelo soro de pacientes com doenças infecciosas e parasitárias. Além disso, a predição de estruturas presentes em região de desordem estrutural, permite sugerir que as mesmas estão disponíveis para ligação em anticorpos, independentemente de estarem em sua conformação ou na estrutura tridimensional correta, fator muitas vezes limitante para a produção de proteínas recombinantes (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. *et al.*, 2015; MENEZES-SOUZA; DE OLIVEIRA MENDES; DE ARAUJO LEAO; DE SOUZA GOMES *et al.*, 2015).

Cabe destacar que a seleção de proteínas expressas em estágios específicos dos parasitos encontrados no hospedeiro vertebrado é um fator determinante na escolha de alvos para diagnóstico sorológico (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. *et al.*, 2015; MENEZES-SOUZA; DE OLIVEIRA MENDES; DE ARAUJO LEAO; DE SOUZA GOMES *et al.*, 2015). Proteínas expressas no estágio

amastigota do parasito devem ser consideradas como potenciais alvos para diagnóstico, visto que essa é a forma biológica que permanece em contato com o sistema imune do hospedeiro vertebrado durante a infecção do mesmo. Diversos estudos optaram por trabalhar com proteínas antigênicas expressas na forma amastigota de parasitos do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, mostrando melhoria na sensibilidade, logo diminuindo a chance de não identificar indivíduos positivos durante a execução do teste (AGUIRRE; SILBER; BRITO; RIBONE *et al.*, 2006; BROTHERTON; RACINE; FOUCHER; DRUMMELSMITH *et al.*, 2010; DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. *et al.*, 2015; ELISEI; MATOS; CARVALHO; CHAVES *et al.*, 2018; GOPFERT; GOEHRING; KLEIN; ILG, 1999; MENEZES-SOUZA; DE OLIVEIRA MENDES; DE ARAUJO LEAO; DE SOUZA GOMES *et al.*, 2015; PALATNIK-DE-SOUSA; GOMES; PARAGUAI-DE-SOUZA; PALATNIK *et al.*, 1995).

Atualmente, existem limitações nas metodologias de diagnóstico sorológico da LTH, relacionado à baixa sensibilidade e reatividade cruzada em indivíduos de áreas endêmicas e portadores de outras patologias, como por exemplo, doença de Chagas (DC). Parte dos problemas de sensibilidade e/ou especificidade das proteínas alvos poderiam ser resolvidos pela identificação de epítomos de linfócitos B, com elevado score, e análise de divergência dessas regiões com alvos presentes no hospedeiro e em microrganismos que apresentam reatividade cruzada com a LTH (MENDES; REIS CUNHA; DE ALMEIDA LOURDES; RODRIGUES LUIZ *et al.*, 2013; MENEZES-SOUZA; DE OLIVEIRA MENDES; DE ARAUJO LEAO; DE SOUZA GOMES *et al.*, 2015; SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. *et al.*, 2017). Nesse sentido, alguns trabalhos desenvolveram proteínas quiméricas reunindo apenas epítomos de linfócitos B dos antígenos alvos. Como estratégia, optaram por avaliar se são divergentes de proteínas presente no hospedeiro e em microrganismos que co-ocorrem em áreas endêmicas e estão associados à reatividade cruzada. Com isso, observou-se aumento na sensibilidade e especificidade em testes de diagnóstico sorológico quando comparado ao uso das respectivas proteínas recombinantes (AGUIRRE; SILBER; BRITO; RIBONE *et al.*, 2006; MARCIPAR; ROODVELDT; CORRADI; CABEZA *et al.*, 2005). Existe ainda uma crescente demanda para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais sensíveis, rápidos e de fácil execução e passíveis de serem aplicados no campo, como testes imunocromatográficos rápidos (GOMES; PAULA; MORAIS; SOARES *et al.*, 2014).

Recentemente, foi realizado pelo nosso grupo trabalhos utilizando métodos de imunoinformática e imunoproteômica para identificar novas proteínas candidatas ao

diagnóstico sorológico da LTH (COSTA DUARTE; DOS REIS LAGE; LAGE; MESQUITA *et al.*, 2016; DUARTE; LAGE; LAGE; MARTINS *et al.*, 2016; MENEZES-SOUZA; DE OLIVEIRA MENDES; DE ARAUJO LEAO; DE SOUZA GOMES *et al.*, 2015; MENEZES-SOUZA; MENDES; GOMES MDE; BARTHOLOMEU *et al.*, 2015). A fim de empregar uma abordagem imunoproteômica a partir de antígenos presentes em extratos totais do parasito *L. braziliensis*, em fase promastigota e amastigota, identificou-se proteínas reconhecidas por anticorpos de pacientes com LTH, descartando todos os demais *spots* reconhecidos por soros de pacientes negativos e que vivem em áreas endêmicas, além de positivos para DC (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. *et al.*, 2015).

Diversos alvos foram especificamente reconhecidos pelas amostras de soro de pacientes com LTH. Foi então realizada espectrometria de massa dos *spots* que permitiram identificar 20 proteínas do parasito *L. braziliensis*. Dessas, 5 proteínas foram selecionadas, clonadas e expressas em vetor de expressão para aplicação em sorodiagnóstico da LTH, não sendo observadas reações cruzadas com pacientes negativos de área endêmica ou com DC. Os valores de sensibilidade e especificidade mostraram-se superiores quando comparados com testes de ELISA utilizando extrato solúvel do parasito. Porém, o estudo supracitado não testou as proteínas juntas como um candidato diagnóstico e nem avaliou por meio de ferramentas de imunoinformática os epítomos de células B das proteínas caracterizadas, abrindo oportunidade para que esse tipo de análise fosse realizada, e os epítomos associados em uma única proteína quimérica, assim como também realizar a avaliação com painel sorológico mais amplo, já que apesar de resultados promissores, ainda são observados problemas de sensibilidade e especificidade, que podem ser melhorados.

3 - JUSTIFICATIVA

A LTH é hoje classificada como um grave problema de saúde pública pela OMS. Dentre as dificuldades que cercam a doença, destaca-se o estigma social que causa, custo com tratamento para os órgãos públicos de saúde e dificuldade de controle. A vigilância e o monitoramento, bem como o diagnóstico precoce e tratamento adequado de casos confirmados, são de suma importância no controle da doença.

Existe hoje uma dificuldade no que diz respeito ao diagnóstico sorológico da LTH. O presente trabalho viu a necessidade de criação de um novo antígeno, uma vez que os avanços na área de química de proteínas permitiram revolucionar o campo de testes diagnósticos. O uso das novas tecnologias de construção de genes sintéticos e de proteínas recombinantes, facilita a produção e a caracterização proteica e ainda permite o preparo de grandes quantidades de antígenos em laboratório. Tais explorações tecnológicas trazem como benefício a possibilidade de criação de uma proteína quimérica que melhore de maneira significativa o diagnóstico sorológico da LTH, uma vez que há limitações no que diz respeito a sensibilidade e especificidade para o sorodiagnóstico da LTH.

Durante os últimos anos, o nosso grupo vem desenvolvendo estudos na área de imunoproteômica que culminaram na identificação de 20 proteínas potenciais candidatas para uso no diagnóstico sorológico, fato que motivou a firmação de parcerias a fim de explorar o campo mais a fundo. Tais fatores, corroborados com a experiência do grupo na produção de proteínas recombinantes, motivaram o desenvolvimento de um antígeno para ser utilizado no diagnóstico sorológico, elaborado na forma de proteína quimérica desenvolvida a partir de epítomos de linfócitos B, que apresentaram melhores valores de predição, derivados a partir de proteínas previamente identificadas por meio de ensaios de imunoproteômica empregando o parasito *L. braziliensis*, além de serem proteínas encontradas em estágios do parasito encontrado no hospedeiro, o que pode gerar importante impacto na sensibilidade do antígeno (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. *et al.*, 2015).

A proposta foi de obter um antígeno e avaliar o seu potencial uso no diagnóstico sorológico da LTH, antígeno este passível de ser aplicado em ensaios sorológicos, como teste imunoenzimático ELISA, imunocromatográfico, dentre outros, fornecendo uma alternativa de baixo custo, fácil execução, e principalmente com elevada acurácia, o que contribuirá para identificar adequadamente o número de casos de LTH e, como consequência, permitir o emprego de medidas de prevenção, controle e tratamento em áreas endêmicas do Brasil.

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

Construir um gene codificador de uma proteína quimérica, baseada em epítomos de reconhecimento para linfócitos B presentes em proteínas previamente identificadas pela técnica de imunoproteômica no parasito *L. braziliensis*, e avaliar o seu potencial uso para o desenvolvimento de testes sorológicos para detecção da LTH.

4.2 - Objetivo específicos

4.2.1 – Fase I

- Selecionar potenciais proteínas do imunoproteoma de *L. braziliensis* (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. *et al.*, 2015) que apresentem elevada expressão no estágio amastigota e que sejam reconhecidas por indivíduos que apresentem a manifestação clínica cutânea ou muco-cutânea da LTH;
- Utilizando análises de géis bidimensionais, determinar o nível da expressão das proteínas selecionadas nos estágios promastigota e amastigota do parasito, e apresentar na forma de gráficos de Heat-map;
- Por meio da análise por *western blot* em géis bi-dimensionais, avaliar a antigenicidade para o reconhecimento das proteínas selecionadas, utilizando amostras de pacientes com a manifestação clínica cutânea ou muco-cutânea da LTH, e apresentar na forma de gráficos de *Heat-map*;
- Utilizando ferramentas de Imunoinformática, recuperar sequências das proteínas selecionadas por imunoproteômica do banco de dados TritypDB e avaliar em relação a presença epítomos lineares de linfócitos B, assim como a divergência em relação a proteínas do hospedeiro e consequentemente, identificar regiões com maior probabilidade de antigenicidade;

- Avaliar a similaridade com proteínas do proteoma predito de diferentes microrganismos com o intuito de eliminar ou minimizar reação cruzada quando empregadas em teste imunodiagnósticos;
- Ranquear e selecionar os epítomos para compor a proteína quimérica.

4.2.2 – Fase II

- Sintetizar o gene e expressar na forma de proteína recombinante quimérica por meio da clonagem no vetor *pET-28a(+)*;
- Padronizar e avaliar o desempenho da proteína no teste de imunodiagnóstico por ELISA, empregando soro de indivíduos portadores de LTH causada por *L. braziliensis*, formas clínicas cutânea e mucosa, e soros de indivíduos controle e de indivíduos portadores de outras doenças de relevância no diagnóstico diferencial;
- Avaliar os resultados obtidos por meio dos testes sorológicos descritos atualmente na literatura, bem como comparar sua eficácia com o diagnóstico da LTH por meio da observação de sensibilidade e especificidade, levantando dados de revisão bibliográfica.

5 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi subdividido em fases 1 e 2, com o objetivo de elucidar melhor as atividades realizadas em cada etapa desde o delineamento experimental até a execução. A Figura 3 traz o fluxograma contendo toda a parte de análise prévia realizada de maneira estratégica para seleção das proteínas que viriam a compor a proteína quimérica. Cada etapa descrita é importante para assegurar a obtenção de um produto que tenha bom resultado como uma potencial ferramenta para o diagnóstico da LTA.

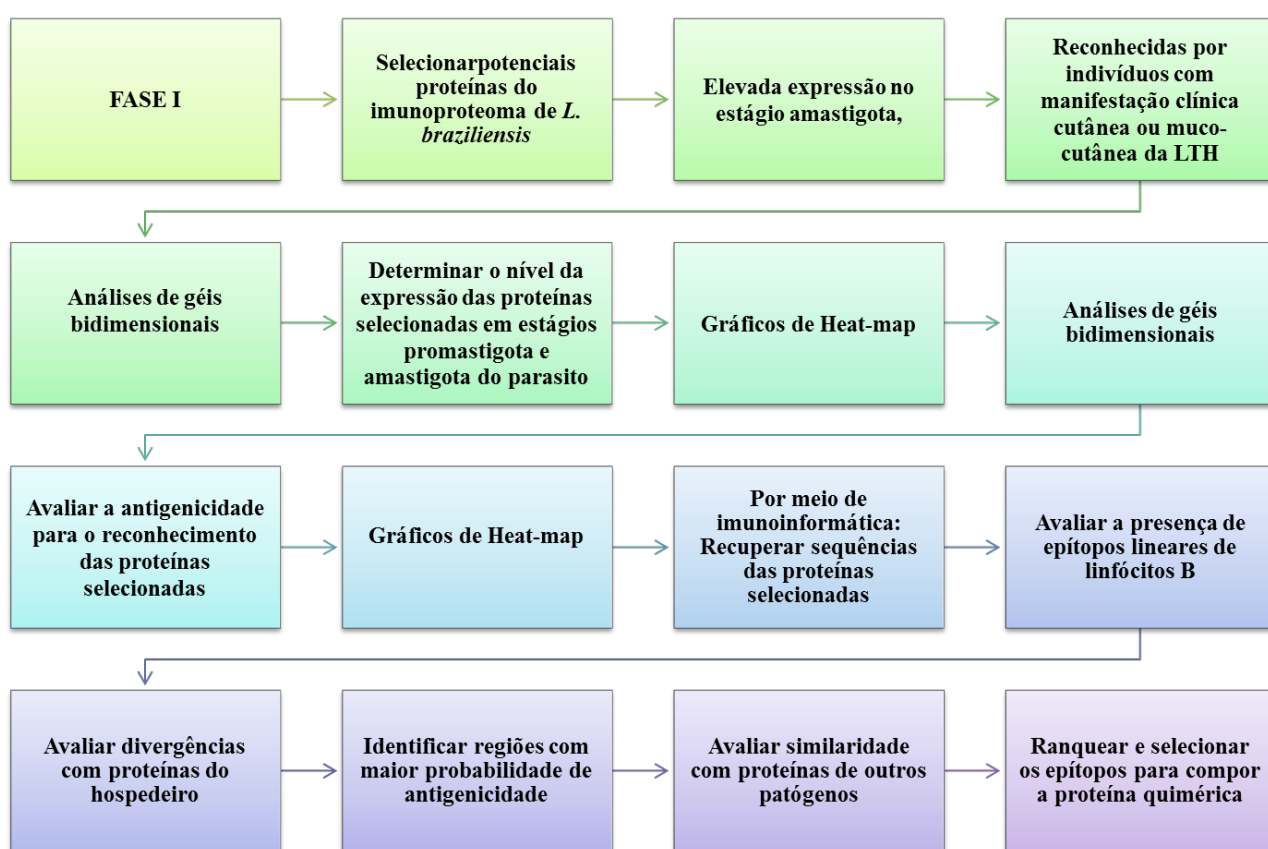


Figura 3: Fluxograma com o percurso seguido na seleção dos alvos a comporem a proteína quimérica.

O fluxograma explicando as etapas seguidas após a seleção dos alvos, com a produção da proteína quimérica, purificação e uso em padronização de teste diagnóstico utilizando soros de pacientes positivos e com outras infecções e realização das análises após os testes estão elucidados na figura 4.

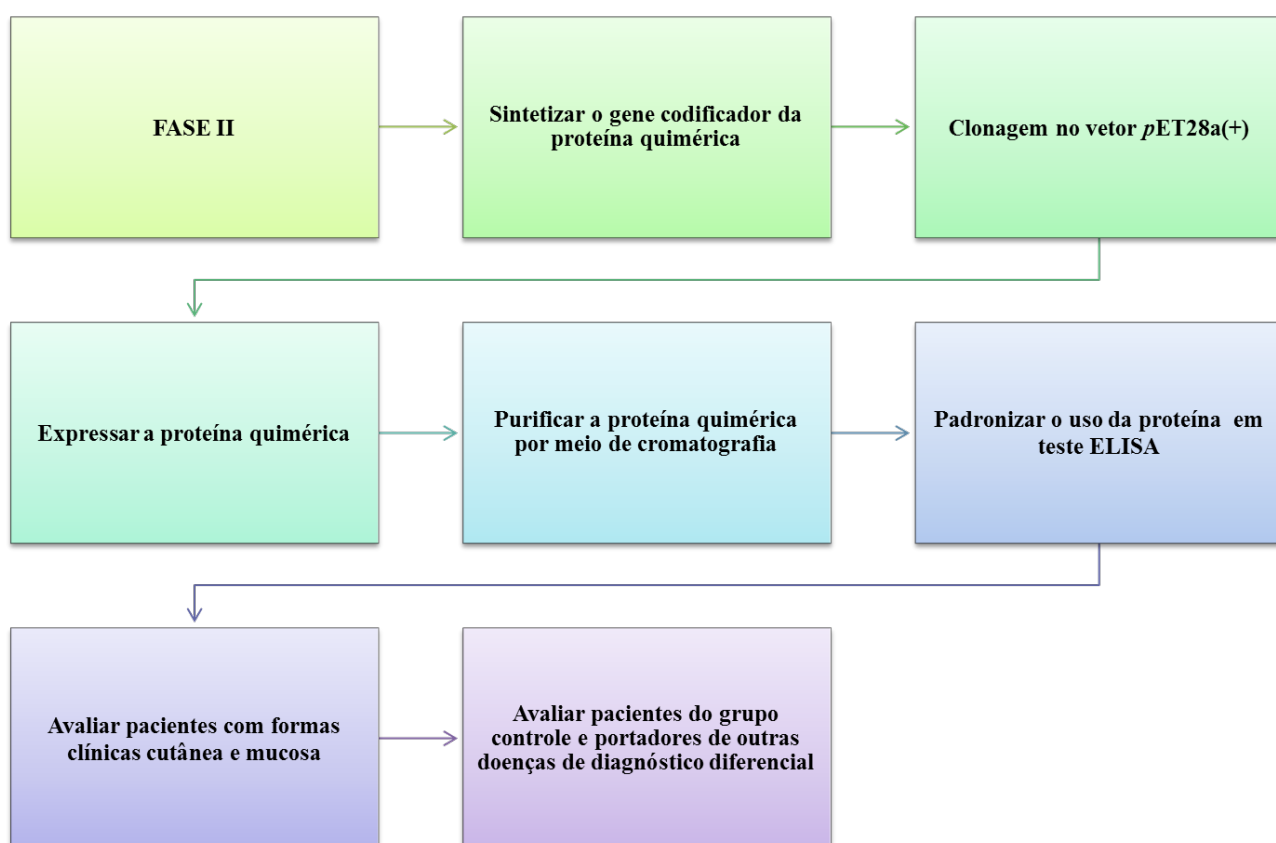


Figura 4: Fluxograma com o percurso seguido na síntese, expressão, purificação e padronização de teste ELISA para diagnóstico da LTH.

6. METODOLOGIA

6.1 – Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG), com o número de processo CAAE–323431.14.9.0000.5149 e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG) com o número de processo 333/2015.

6.2 – Amostras de soros de pacientes

As seguintes amostras de soro foram utilizadas para a realização dos ensaios de ELISA para o sorodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana: soros de pacientes infectados pelo parasito *Leishmania braziliensis*, apresentando a patologia na forma mucosa (n=35), forma cutânea (n=35). Para averiguar presença de reações cruzadas, foram testados soros de pacientes não-infectados (controle negativo, n=35) e soros de pacientes com Doença de Chagas (n=35).

6.3 – Parasitos

A obtenção dos extratos solúveis de *Leishmania* (SLA) de *L. braziliensis* foi feita a partir de cerca de 2×10^8 promastigotas/mL, durante a sua fase log. Os parasitos foram centrifugados a 4,000 x g, lavados três vezes com adição de 5 mL de PBS estéril. Após cinco ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, a suspensão celular foi centrifugada com uma força de $8,000 \times g$ por 20 minutos a 4°C e alíquotas foram etiquetadas e estocadas em freezer a -80 °C conforme descrito por COELHO et al., 2003. Uma estimativa da concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando o kit Protein Assay Reagent (Thermo Scientific®), de acordo com as recomendações do fabricante.

6.4 – Seleção de alvos a comporem a proteína quimérica

Os epítomos foram selecionados a partir de 20 proteínas reconhecidas pela técnica de imunoproteômica (DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. et al., 2015). Das 20 proteínas, 13 foram reconhecidas no estágio amastigota do parasito, e selecionadas por estarem em maior contato com o sistema imune do

hospedeiro. Dessas, 32 epítomos de célula B estavam em região de desordem estrutural, significando linearidade, porém 19 delas mostraram-se similares a *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium leprae* e foram excluídas, restando 13 que mostraram divergência maior que 80%, aumentando a possibilidade de não ocorrer reações cruzadas. O fato de os epítomos selecionados das proteínas possuírem divergência com *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium leprae* objetiva evitar reações cruzadas entre indivíduos portadores de patologias causadas por tais patógenos.

Os 13 epítomos selecionados para compor a proteína quimérica são sublinhados abaixo, havendo uma metionina inicial, cauda de histidina e *stop codon*.

**MTNSAKSANEGSGSGEDEEVAEAPPAEAAAPAEVTAGGSGSGHDFSHQGG
GDNASKGSGSGLEDQAPSTGSGSGEGESREDLDMPPDPALGSGSGMSPEDATGG
SGSGATKRYTGNGKRGSGSGKAGTGPDAEKSGSGSVTYAGPDGSVSEKSGSG
KDTYEGEWRNDSATGSGSGAKDAEKKKTGSGSGKMNEPAPPFGSGSGWKKGD
ATMKPEHHHHHHH***

A sequência do gene codificador da quimera foi otimizada pelo software "Codon Optimization Tool" da IDT para expressão na bactéria *E. coli*:

**ATGACGAACAGCGCCAAAAGCGCCAACGAGGGCTCGGGAAGCGGCGA
AGACGAAGAGGTAGCAGAAGCGCCACCTGCCGAGGCAGCCCCAGCAGAAGT
AACTGCAGGTGGCTCCGGTTCGGGTTCACGATTTCTCCCATCAGGGTGGGGG
TGACAATGCTTCGAAAGGTTCGGGTTCGAGTTGGAAGACCAAGCGCCCTCA
ACAGGTTCTGGCTCCGGCGAAGGTGAGTCCCGCGAGGATCTGGATATGCCG
CCAGACCCAGCATTGGGTTCGGGAAGCGGAATGTCCCCCGAGGACGCGACA
GGTGGCAGCGGCAGCGGAGCCACAAAACGCTACACTGGAAATAAAGAGCGT
GGCTCGGGCAGTGGCAAAGCCGGTACTGGACCAGACGCTGAGAAGTCTGGT
TCTGGTAGTGGCGTTACGTATGCTGGTCCCGACGGCAGTGTCAGTGAAAAA
GGGTCAGGGAGCGGCAAGGACACTTATGAAGGAGAATGGCGTAATGATTCTG
GCGACAGGTAGTGGATCTGGGGCTAAGGATGCTGAAAAAAGAAAACGGGA
AGCGGTTCTGGCAAATGAATGAACCCGCCCCACCATTGTTGGTAGTGGCTCGG
GATGGAAGAAGGGTGACGCGACGATGAAGCCCGAACATCATCACCACCACC
ACTAA**

O potencial dos peptídeos de atuarem como epítomos é mantido na quimera (Score de 1.74). Em adição, a proteína tem alta desordem estrutural, predita pelo programa IUPRED (Score de 0,91; 0,74 e 0,77), significando que os peptídeos estarão disponíveis para ligação com anticorpos, não possuindo conformação.

A sequência do gene codificador da proteína quimérica foi desenhada utilizando o software Gene Oligo Explorer (versão 1.5, 2010). Em seguida, o gene foi sintetizado por empresa de biotecnologia especializada.

6.5 – Ligação do gene em pGEM®-T Easy Vector Systems

O plasmídeo contendo 4µg do gene quimérico liofilizado foi armazenado a -20°C até o momento do uso. Para o uso, o plasmídeo foi primeiramente centrifugado a 6000 G por 5 minutos, a fim de evitar perda de plasmídeo que porventura estivesse aderido à tampa. Em seguida, o plasmídeo foi ressuspensionado utilizando-se 50µL de água ultrapura aquecida a 50°C e homogeneizado em vórtex por 1 minuto. Posteriormente, o microtubo contendo o plasmídeo ressuspensionado foi centrifugado a 6000 G por mais um minuto.

6.6 – Transformação e expressão da proteína quimérica

Na etapa de transformação, 1µL do plasmídeo quimérico foi adicionado a 50µL de células competentes Arctic Express (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) previamente armazenadas a -80°C. Em seguida as amostras foram transferidas para cubetas de eletroporação MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, EUA) de 0,1cm, e submetidas a um pulso de 2,50kV no equipamento de eletroporação MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, EUA). Após a eletroporação, foram adicionados 200µL do meio de cultura 2xYT líquido, seguido por incubação durante uma hora a 37°C sob agitação em shaker a 200rpm. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar 1,5% contendo 50µg/mL de Kanamicina (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA) e 20µg/mL de Gentamicina (Neoquímica, Anápolis, Brasil) e distribuídas uniformemente pela placa utilizando uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C.

Após crescimento, 5 colônias foram submetidas à reação de PCR, a fim de verificar-se a presença do plasmídeo no vetor de expressão, utilizando-se 50µL de Master Mix (Promega), 10µL de primer T7 *forward* e *reverse* a 2 milimolar e 40µL de água ultra-pura. O termociclador (T-100 Biorad®) foi programado em temperatura inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a temperatura de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento a 60°C por 30 segundos e temperatura de extensão a 68°C por 2 minutos, e ainda extensão final a 68°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a separação em gel de agarose 1% a 100-120 volts em tampão TAE 1X, contendo 0,3µg/µL de

brometo de etídio (Bio-Rad, Hercules, EUA). Para indução da expressão da proteína quimérica, a colônia de bactérias isoladas no sistema de clonagem foi inoculada em dois Erlenmeyers de 100 mL cada contendo 50mL de meio de cultura 2xYT (Tryptona/Peptona + Extrato de Levedura + NaCl + Kanamicina 50µg/mL e Gentamicina 20µg/mL) e incubadas overnight a 37 °C sob agitação a 200RPM em estufa. Em seguida, as 25mL das culturas foram inoculadas em cada um dos quatro Erlemeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio 2xYT e cultivadas até a densidade ótica (DO) de 0,6-0,8 a 37°C, sob agitação, a 200 RPM, por três horas.

Após atingir a DO desejada, a expressão foi induzida com a adição de 0,1mM de Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo (IPTG) (Invitrogen®, São Paulo, Brasil) por 24 horas a 12°C sob agitação a 200RPM. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 7000 RPM, por 40 minutos a 4°C, na centrífuga “5804R” (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante desprezado. Em seguida, os pellets foram armazenados a -80°C. Aliquotas de 1 mL da cultura imediatamente antes da adição de IPTG, e após o período de indução da expressão, foram também coletados em microtubos e centrifugadas por 5 minutos a 8.000 RPM e armazenado a -20°C, para serem utilizadas como controle de expressão.

O pellet contendo a cultura após a etapa de expressão foi ressuspensionado em 100mL de PBS (Na₂HPO₄ + NaHPO₄ + NaCl, pH 7,4) contendo 30mM de Imidazol e lisozima 100µg/mL (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) e incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, o extrato foi lisado em sonicador (DES 500 – UNIQUE®) após 10 ciclos de 1 minuto de sonicação em gelo, cada ciclo com intervalo de 30 segundos e potência 40% a amostra foi centrifugada por 5000RPM por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante coletado (fração solúvel) foi filtrado em coluna de cromatografia (His Trap HP) contendo 5mL de resina para purificação de proteína. A coluna contendo resina previamente regenerada foi lavada utilizando três vezes o seu volume com o tampão A (PBS contendo imidazol 30mM). Na última lavagem, foi deixada sob agitação com tampão A por 15 minutos. Em seguida, a amostra contendo a fração solúvel foi aplicada duas vezes na coluna. As frações de *flowthrough* foram coletadas. Após a passagem de toda a amostra, a eluição foi realizada por meio da adição do tampão B (PBS contendo imidazol 500mM) e a coluna foi mantida a 8°C overnight. Em seguida, as frações eluídas contendo a proteína recombinante foram coletadas em eppendorfs e armazenadas a 8°C.

As frações obtidas em tempo 0 (pré-indução), tempo 24 pós indução e proteína após purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12.5%. As amostras obtidas nos ensaios de expressão e purificação foram submetidas à separação por

eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-acrilamida 40%. O gel de separação 12,5% foi preparado utilizando tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8, SDS 0,01%, persulfato de amônio 0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6,8. As amostras obtidas da indução e teste de solubilidade foram adicionadas 25 µL de tampão de amostra 4X (SDS 10%, Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, azul de Bromofenol 1%, 2-β-mercaptoetanol 5% e glicerol 10%) e 75µL de água de MilliQ. As amostras foram então pré-aquecidas a 100°C durante 10 minutos para desnaturação das proteínas e posteriormente aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada em aparelho Mini Protean II Biorad®, utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1% e pH 8,3) sob voltagem constante de 100 volts. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 30 minutos com a solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) em temperatura ambiente e em seguida descorados overnight em solução etanol 30% e ácido acético 10% a temperatura ambiente.

As amostras de proteína quimérica purificadas foram 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 e a leitura realizada em aparelho Versamax (Molecular Devices®, Sunnyvale, EUA) com comprimento de onda de 562nm.

6.7 – Padronização de ensaio imunoenzimático ELISA

No desenvolvimento do ensaio de ELISA indireto Para a padronização do teste, foram utilizadas placas de ELISA 96 poços (Nalge Nunc Intl®, Penfield, EUA) iniciando-se pela seleção das concentrações do antígeno (0,01; 0,1; 1,0 e 10µg) e do conjugado (1:500; 1:1000; 1:10.000 e 1:5000). Placas de ELISA foram sensibilizadas com uma solução contendo a proteína quimérica recombinante, em concentrações previamente determinadas por meio de curvas de titulação, sendo diluídas em tampão carbonato, pH 9,5, por 16 horas, a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS 1x e Tween 20 0,05% (PBS-T) e posteriormente bloqueadas com a solução de bloqueio (PBS 1x, Tween 20 0,05% e caseína 5%). Como fonte de primeiro anticorpo, as amostras de soros dos pacientes foram diluídas em tampão de incubação (PBS-T e caseína 0,5%), com concentração previamente determinada após a realização de curva de titulação. O segundo

anticorpo, anti-IgG humano ligado à enzima peroxidase (Sigma-Aldrich®), também em concentração determinada após a realização de curva de titulação. A atividade foi revelada com a solução composta de *orto*-fenilenodiamino, água oxigenada e tampão citrato-fosfato pH 5,0. Após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de ácido sulfúrico 2 N. As leituras da absorbância das amostras foram realizadas em leitor de ELISA (Molecular Devices®, Spectra Max Plus, Concord, Canada), no comprimento de onda de 492 nm.

6.8 – Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 5.00 (Prism Software, Irvine, EUA). Os pontos de corte (*cut-off*) para validação da sensibilidade e especificidade dos antígenos foram determinados após a construção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Na etapa de análise do desempenho da ELISA, os seguintes parâmetros foram avaliados: sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (AUC), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de probabilidade positiva (RP+), razão de probabilidade negativa (RP-) e índice de Youden (J). Análises de concordância entre as técnicas serão empregadas utilizando o índice Kappa.

7. RESULTADOS

A seção de Resultados será apresentada sob a forma de artigo científico, submetido ao periódico *Applied Microbiology and Biotechnology* em Janeiro de 2021, conforme as normas do Programa de Pós-Graduação.



Development of a chimeric protein based on a proteomic approach for the serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis

Guilherme Caetano Garcia¹ · Ana Maria Ravena Severino Carvalho¹ · Mariana Costa Duarte^{1,2} · Matheus Fernandes Costa e Silva¹ · Fernanda Alvarenga Cardoso Medeiros¹ · Eduardo Antonio Ferraz Coelho^{1,2} · Dênia Monteiro de Moura Franco¹ · Denise Utsch Gonçalves¹ · Tiago Antônio de Oliveira Mendes³ · Daniel Menezes-Souza^{1,2}

Received: 28 January 2021 / Revised: 11 August 2021 / Accepted: 14 August 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Leishmania braziliensis is responsible for most cases of human tegumentary leishmaniasis (HTL) and has caused a wide range of clinical manifestations, including cutaneous (CL) and mucosal leishmaniasis (ML). The diagnosis is based on criteria that consider epidemiological data, clinical findings, and laboratory tests and is hard to establish. For laboratory tests, none of the assays available can be considered gold standards for disease detection. In addition, the Montenegro skin test, essential to supporting infectologists in the clinical management of the disease, is no longer available in Brazil. Thus, the aim of this study was to develop new targets to be used in diagnostic tests for HTL. In the first step, we carried out two-dimensional gel electrophoresis, followed by mass spectrometry, combined with heat map analysis and immunoproteomics approach, and disclosed eight proteins expressed in the amastigote stage specifically recognized by serum from CL and ML patients. A chimeric protein was designed based on the combination of thirteen linear B-cell epitopes, identified by immunoinformatics analysis, from *L. braziliensis* proteins. Our results showed that the strategy used in this work was successful in developing an antigen to be used in immunological assays (100.0% sensitivity and specificity) in the detection of HTL cases and in comparison with results obtained from an ELISA using soluble *L. braziliensis* antigen (SLb-Antigen) and immunofluorescence assay (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ). The present technology opens the door for its use in field exams by means of an immunochromatographic test, which will be even more helpful in regions without laboratory structures.

Key points

- Rational strategy to develop antigens.
- Integration between immunoproteomic and immunoinformatics analysis.
- Chimeric protein shows high performance in HTL diagnosis.

Keywords *Leishmania braziliensis* · Human tegumentary leishmaniasis · Proteomic · Immunoinformatics · B-cell epitope mapping · Chimeric protein · Immunodiagnosis

Introduction

Human tegumentary leishmaniasis (HTL) is an important public health concern in central and south America and is caused by obligatory intracellular pathogens of the genus *Leishmania* (Alvar et al. 2012). The disease is transmitted to a human host by the bite of an infected sandfly, infecting predominantly macrophages, in turn leading to different clinical forms, depending on the host's immune response and the parasite species involved (Indiani de Oliveira et al. 2004). *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is responsible for most cases of HTL, especially in Brazil, causing a wide range

✉ Daniel Menezes-Souza
dmsouza@ufmg.br

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, Brazil

² Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³ Departamento de Bioquímica E Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

of clinical and immunopathological manifestations: cutaneous leishmaniasis (CL) and mucosal leishmaniasis (ML) (de Almeida et al. 2003; Grimaldi et al. 1989; Indiani de Oliveira et al. 2004; Machado-Coelho et al. 2005; Marzochi and Marzochi 1994; Silveira et al. 2004). Estimates have shown that in Brazil, 17,119 cases were diagnosed in 2018 (SINAN 2018).

In CL, the most common and least severe form, patients present simple cutaneous lesions at the site of the sandfly bite, characterized by a well-defined ulcer on the skin, together with frequent findings of amastigotes, which can heal spontaneously (Grimaldi and Tesh 1993; Marsden 1986; Saravia et al. 1985). However, in ML, an invasive hyperallergic and destructive form of HTL, the parasite is able to metastasize through the lymphatic system or hematogenesis. Furthermore, patients present slow and progressive destruction of submucosal and mucosal tissues in the mouth and nose, with rare findings of amastigotes and exaggerated delayed-type hypersensitivity (DTH) (Grimaldi and Tesh 1993; Machado-Coelho et al. 2005; Marsden 1986; Reithinger et al. 2007; Saravia et al. 1985).

The diagnosis is based on criteria that consider clinical findings, laboratory tests, and epidemiological data and is hard to establish (Goto and Lindoso 2010). In this context, the epidemiological connection among individuals is clear in areas with a high prevalence of HTL. However, the clinical manifestations of the disease are diverse, and a combination of clinical findings with one or more diagnostic methods is frequently needed to obtain an accurate result (Goto and Lindoso 2010). Laboratory tests include microscopic/molecular detection of the parasite in the sample obtained from the lesion, the Montenegro skin test (MST), and immunological tests to provide indirect detection (Gomes et al. 2014b). The MST identifies a DTH response to pathogen antigens in HTL patients but does not discriminate between cured and active disease (Gomes et al. 2014b). For ML patients, an otorhinolaryngological exam associated with an MST has been essential to achieving a differential diagnosis regarding HTL (Diniz et al. 2011). However, MST is no longer available in Brazil, and this type of diagnosis has been discontinued. Regarding parasitological tests, the sensitivity of direct identification is low, particularly in the new world species, in which chronic and mucosal diseases are more frequent (Goto and Lindoso 2010; Schubach et al. 2001). Tests for direct diagnoses include the histopathological exam, cell cultures, and inoculation of samples in laboratory animals. Sensitivity for such tests varies from 15 to 52%. Specificity, on the other hand, reaches nearly 100% (Ameen 2010; Boggild et al. 2010; Schubach et al. 2001; Weigle et al. 1987). Parasitological diagnosis is also possible through the detection of parasite DNA by PCR, which can have a specificity of 100%, sensitivity ranging from 20–70%, and accuracy of 86%. However, there are limitations regarding

the cost and application of the test in a large portion of the population, in addition to the need for proper collection and storage of the material (de Paiva-Cavalcanti et al. 2015; Srivastava et al., 2010; Sundar and Rai 2002).

Most of the conventional serological tests, such as indirect immunofluorescence assay test (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), use a complex mixture of the entire parasite itself or crude *Leishmania* antigen preparations, respectively (Braga Lde et al. 2015; Cataldo et al. 2010). These antigens show variable sensitivity due to antigenic differences among *Leishmania* isolates and the lack of specificity due to cross-reactivity with other diseases, such as Chagas disease (CD), mainly associated with the sharing of similar proteins by phylogenetic proximity with a *Trypanosoma cruzi* parasite (Malchiodi et al. 1994). However, serological tests have advantages for the diagnosis of leishmaniasis, as early detection of the infection before the development of symptoms (lesions), non-invasiveness, accessibility, and easy-to-use diagnostic tests (Menezes-Souza et al. 2015b). Thus, to date, no gold standard has been defined for TL diagnosis, and high-quality serological assays are urgently needed (Gomes et al. 2014a). In this sense, serological diagnoses are considered to be good diagnostic methods and can help if combined with other diagnostic methods. Such tests vary in sensitivity and specificity. Specificity for indirect immunofluorescence reaches 81% (Sarkari et al. 2014), while sensitivity ranges from 27.7 to 88.5% (Guimaraes et al. 1990; Schubach et al. 2001; Sotto et al. 1989). For direct agglutination, results of specificity and sensitivity are 91.8% and 90.5%, respectively (Hailu 2002). For comparison purposes, the current study showed specificity and sensitivity results of 65.21% and 64.29%, respectively, for soluble *Leishmania* antigen in ELISA. Other ELISA tests using different antigen preparation show specificity of 65.71% and sensitivity ranging from 66.9 to 100% (Guimaraes et al. 1990; Sato et al. 2017). Following this connection, the choice of antigen is an important step to improving the performance of serodiagnostic techniques. Thus, the purpose of this work was to develop more refined antigens of *L. braziliensis*, in more detail, a chimeric protein containing multiple B-cell epitopes, aiming to improve the diagnose of HTL.

Material and methods

Human sera samples

Samples were obtained from the UFMG Clinical Hospital Program (School of Medicine, UFMG). All sera were collected, processed, and stored as described previously (Carvalho et al. 2018; Elisei et al. 2018). Procedures performed were in

accordance with the ethical standards of the national research committee and with the 1964 Helsinki declaration.

Using a receiver operating characteristic (ROC curve), the sample size was established (Carvalho et al. 2018; Elisei et al. 2018). For this, PASS software (v. 15, NCSS Statistical Software) was used as follows: [sample allocation ratio (R): R = negative groups for TL/positive groups for TL = $2/2 = 1$] (Hanley and McNeil 1983; Obuchowski and McClish 1997). Seventy sera samples were obtained from HTL patients presenting cutaneous (TL/CL, $n = 35$: 21 males and 14 females, ranging from 24 to 77 years in age) or mucosal (TL/ML, $n = 35$: 27 males and 8 females, ranging from 29 to 81 years in age) clinical manifestation. The diagnosis was confirmed by the clinical evaluation of lesions, which were compatible with TL, as well as by the direct demonstration of parasites in Giemsa-stained smears of biopsies of the patients' skin. Analyses from two biopsy samples collected from each patient were submitted to a conventional PCR technique, and they showed positive results for *L. braziliensis* kDNA (Duarte et al. 2015). The control group (CT, $n = 35$: 22 males and 13 females, ranging from 24 to 51 years in age) consisted of healthy individuals with no clinical signs, suspicions, or positive laboratory tests for TL. Chagas disease samples (CD, $n = 35$: 19 males and 16 females, ranging from 24 to 69 years in age) were identified by the clinical signs associated with laboratory tests for CD,

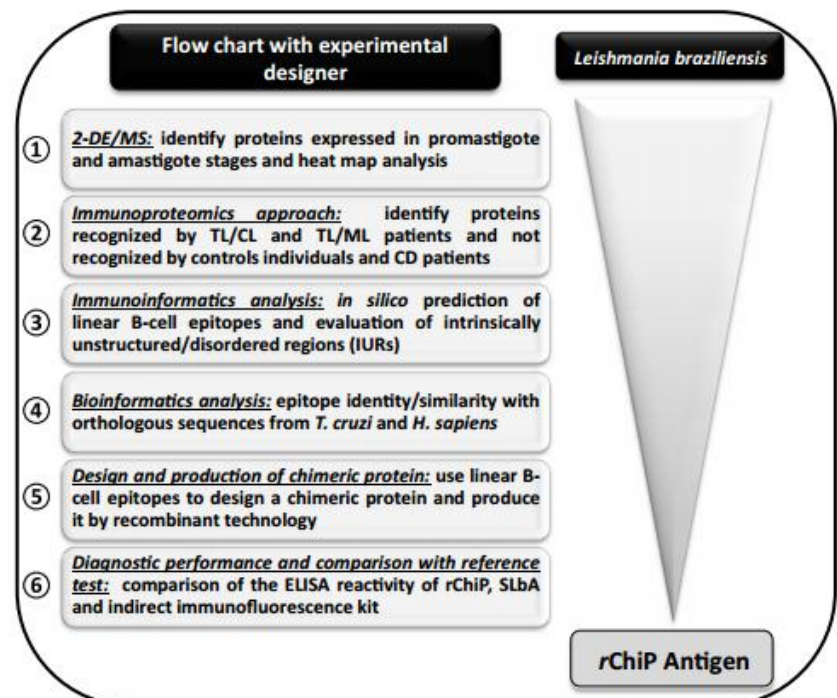
as hemoculture in combination with specific indirect hemagglutination assay (IHA) or ELISA (Salles et al. 2017). The samples used in the immunoproteomics approach were different from the samples used in the ELISA assays.

Strategy followed in the present study

For a better understanding, a flow chart with an experimental designer is shown in Fig. 1. The strategy followed for all the steps is detailed and explained as follows:

1. 2-DE/MS: To identify proteins expressed in the promastigote and amastigote stages, 2-D gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (MS) was used. Digitized images of the protein spots in the 2-D gels were analyzed by specialized software. Heat map analyses were employed to evaluate protein expression based on integrated density.
2. Immunoproteomics approach: Immunoblot assays to identify proteins recognized simultaneously by TL/CL and TL/ML patients and not recognized by controls individuals and CD patients.
3. Immunoinformatics analysis: From the targets selected in the previous step, in silico prediction of linear B-cell epitopes and intrinsically unstructured/disordered

Fig. 1 Flow chart with an experimental designer for the development of a chimeric protein, based on the proteomic approach, for the serological diagnosis of cutaneous and mucosal clinical manifestations of HTL



regions (IURs) was performed to identify regions in proteins with potential for interaction with antibodies.

4. Bioinformatics analysis: To evaluate the specificity of targets for HTL diagnosis, the epitope sequences were compared with proteins from *T. cruzi* and *H. sapiens* regarding identity and similarity.
5. Design and production of chimeric protein: Using linear B-cell epitopes from *L. braziliensis* proteins, the chimeric protein was designed, produced by recombinant technology, and purified by the His-Tag strategy.
6. Diagnostic performance and comparison with reference test: Comparison of the ELISA reactivity of rChiP, SLb-Antigen, and IFA kit was performed.

Two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, and immunoproteomic assays.

This step we have previously shown in an immunoproteomic approach that two *L. braziliensis* stages, stationary-phase promastigote and amastigote-like, have different protein signatures based on the abundance of all detected targets and of the differential targets (Duarte et al. 2015). In this step, three independent experiments were carried out to obtain two-dimensional gels.

Image acquisition and protein expression analysis by heat map approach

Following a technical procedure (Duarte et al. 2015), equivalent gels were stained with colloidal Coomassie brilliant blue G-250. The stained gels were scanned using an ImageScanner III (GE Healthcare) for image analysis. In this step, the analysis workflow of the images is as follows: (i) identify individual spots, (ii) subtract background, (iii) create a reference gel, (iv) match the spots to the reference gel, (v) modify the reference gel, (vi) normalize the gel measurements for comparison, and (vii) calibrate for isoelectric point and molecular weight markers (Maurer 2016). Finally, integrated density was calculated by ImageJ software (open source, version 1.52) (Schneider et al. 2012). The heat map was built using the heatmap.2 function from the gplots package, version 3.0.4 (Warnes et al. 2020), implemented in R software 3.6.1 (Team 2013).

Soluble *Leishmania braziliensis* antigen (SLb-Antigen)

L. braziliensis strain MHOM/BR/75/M2904 promastigotes were cultivated and used to obtain SLb-Antigen, as described previously (Menezes-Souza et al. 2014). The protein concentration was estimated using a BCA protein assay (Thermo Scientific)(Menezes-Souza et al. 2014).

Prediction of sequences and B-cell epitopes and codification of the chimeric gene

For the synthesis of the chimeric protein, first, sequences based on the immune proteome of the parasite *L. braziliensis* were predicted (Duarte et al. 2015) from the database TritrypDB (version 8.1) (Aslett et al. 2010). The methodology and parameters used for the prediction and selection of linear B-cell epitopes to compose chimeric genes were the same as used in previous works (Mendes et al. 2013; Menezes-Souza et al. 2015b). Regions of structural disorder were selected, allowing portions recognized by the host immune system to be used. In addition, regions that resemble the host were discarded, as were regions similar to other pathogens, aiming to avoid cross-reactions. The gene sequence that encodes the chimeric protein was designed using the Gene Oligo Explorer software (version 1.5, 2010). The nucleotide sequence of the synthetic gene was submitted to GenBank and approved (accession number: MW575649).

Expression and purification of recombinant protein

Gene-encoded chimeric protein was synthesized by a specialized biotechnology company, GenScript Company (New Jersey, USA). Electroporation of *E. coli* cells and expression, induction, and the purification of the recombinant chimeric protein (rChiP) was carried out as described by previous studies (Duarte et al. 2015; Menezes-Souza et al. 2015a, b). The samples of purified rChiP were dosed by the bicinchoninic acid colorimetric (BCA) method (Thermo Scientific®, Waltham, USA) according to the manufacturer's recommendations, and the reading was performed using an Emax microplate reader (Molecular Devices®, Sunnyvale, USA) with a wavelength of 562 nm.

ELISA assays employing SLb-Antigen and chimeric proteins

For the standardization of the test, 96-well plates for ELISA (Nalge Nunc Intl.®, Penfield, USA) were used. Different concentrations of the rChiP (0.1, 0.5, 1.0, and 5.0 µg) and dilutions of sera (pool samples from the following individuals: TL/CL, TL/ML, CT, and CD) were also tested in different concentrations (1:50, 1:100, and 1:500) and peroxidase-labeled anti-IgG conjugate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (1:1000, 1:5000, and 1:10,000).

The antigens, SLb-Antigen or rChiP, were diluted in a coating buffer (0.16% Na₂CO₃, 0.24% NaHCO₃, and pH 9.6) were coated onto flat-bottom plates (Costar, USA) overnight at 37 °C, using a concentration of 1.0 µg/well. ELISA assays were carried out as described previously (Carvalho et al. 2018; Menezes-Souza et al. 2015a, b). The reaction was halted by adding 2 M H₂SO₄, and the absorbance at 450 nm

was read with an automatic ELISA microplate reader (EMax, Molecular Devices, USA). Absorbance values were averaged and blank corrected.

IFA — reference laboratory

The samples were also tested using the IFA technique (Bio-Manguinhos, Brazil) in a reference laboratory (FUNED, Brazil) for leishmaniasis diagnosis. The assays were carried out by specialized laboratory technicians according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The cut-off for SLb-Antigen and *r*ChiP was established using the ROC curve on the point that provided the maximum of the sum of sensitivity and specificity (Menezes-Souza et al. 2015b). The performance was evaluated according to the specificity (Sp), sensitivity (Se), negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV), and accuracy (AC). The one-sample Kolmogorov–Smirnov test was used to determine whether a variable was normally distributed. The anti-SLb-Antigen and anti-*r*ChiP reactivity between groups were compared by Kruskal–Wallis, followed by Dunn's post-test for multigroup comparisons. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The degree of agreement between the ELISA assays using the *r*ChiP, SLb-Antigen, and IFA with the parasitological test was determined by Kappa index (κ) values, as described previously (Menezes-Souza et al. 2015b). All of the statistical analyses were performed using GraphPad Prism™ (version 5.0) and GraphPad QuickCals software (<http://www.graphpad.com/quickcals/>).

Results

2-DE/MS, combined with heat map analysis and immunoproteomics approach, disclosed eight proteins expressed in the amastigote stage specifically recognized by HTL patients

The use of protein identified in the stages found in the human host may have a positive impact on the specific antibody titration, triggered by greater exposure to the host's immunological system, and as a consequence, may increase the sensitivity of these targets to detect HTL. Thus, from proteins identified by MS, eight are present in the amastigote stage of the *L. braziliensis* parasite and simultaneously recognized by samples from HTL patients (CL and ML; Fig. 2A and Table 1). The identified proteins were as follows: actin (LbrM.04.1250); heat shock protein 83–1 (LbrM.33.0330); eukaryotic initiation factor 5a, putative (LbrM.25.0580);

paraflagellar rod protein 1D (LbrM.31.0160); cytochrome oxidase subunit IV, putative (LbrM.12.0670); MORN repeat-containing protein 1 (LbrM.30.3350); translation elongation factor 1-beta, putative (LbrM.35.1570); and trypanothione peroxidase (LbrM.15.1100) (Fig. 2A and Table 1). Of this total, five were also identified in the promastigote stage: actin (LbrM.04.1250); heat shock protein 83–1 (LbrM.33.0330); eukaryotic initiation factor 5a, putative (LbrM.25.0580); cytochrome oxidase subunit IV, putative (LbrM.12.0670); and MORN repeat-containing protein 1 (LbrM.30.3350) (Fig. 2A and Table 1).

Protein expression data were better illustrated by the heat map strategy. The heat map representation of the protein expression in the evolutionary stages of the parasite, designed in R language using the gplots library (Team 2013, Warnes et al. 2020), was based on the semi-quantification of protein levels using integrated density data. The data showed high levels of all proteins found in the amastigote as compared to the promastigote stage (Fig. 2B).

Immunoinformatics analysis identified potential epitopes in proteins from the immunoproteome of the *L. braziliensis* with high divergence in comparison to orthologs in *T. cruzi* and *H. sapiens* proteomes

Divergence with proteins encoded by pathogens that co-occur in endemic regions and by their hosts, specifically in the B-cell epitopes, is very important in order to induce the high production of *L. braziliensis*-specific antibodies, and this fact can be essential to obtaining high sensitivity values in diagnostic tests (Carvalho et al. 2018; Mendes et al. 2013). In amino acid sequences of the eight proteins identified by the immunoproteomic approach, as described previously, 22 B-cell epitopes located in regions of structural disorder were identified. In addition, bioinformatics analysis was performed to assess values of identity and similarity between selected proteins and proteins from *T. cruzi* and *H. sapiens* (Table 2). Nine of these epitopes presented a high identity and/or similarity with other pathogens (*T. cruzi*, varying from 78.7 to 100.0%) or with the host (*H. sapiens*, varying from 63.3 to 100.0%) and were therefore excluded. The other 13 predicted epitopes presented similarities varying from 0 to 80% and were selected to compose the chimeric protein (Table 2).

The immunoinformatics analysis of the chimeric protein, designed based on the combination of thirteen epitopes present in proteins, suggests a potential diagnostic target to be employed in HTL.

The chimeric protein is composed of 221 amino acids and thirteen linear B-cell epitopes (Fig. 3A, B). In addition, the

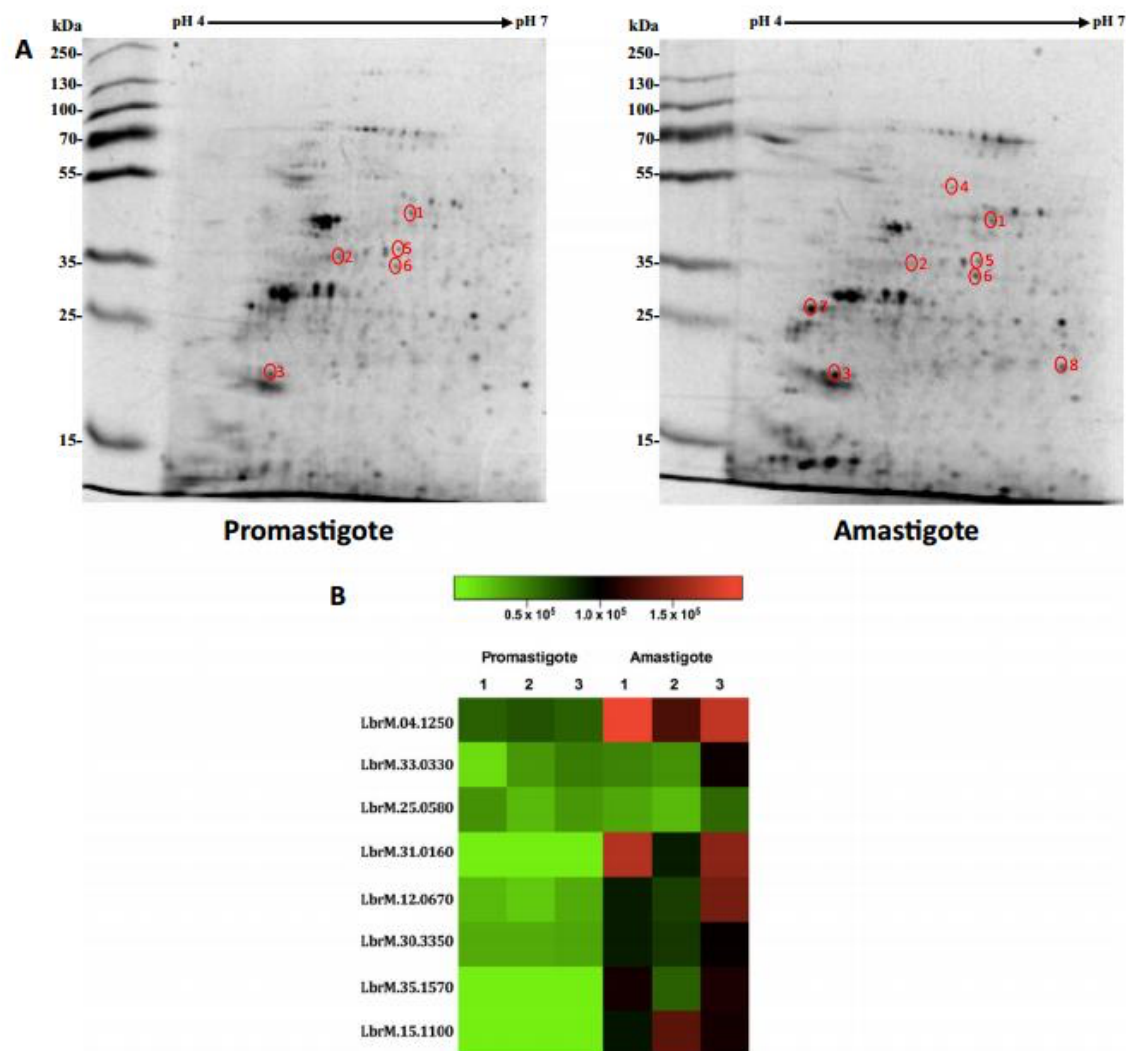


Fig. 2 **A** Two-dimensional profile using the promastigote and amastigote total proteins of *L. braziliensis*. 2-DE was carried out using total protein extracts of stationary promastigote stage (first dimension, IEF, pH range 4 to 7; second dimension, 12.0% SDS-PAGE). **A** stained gel is shown in panel A. The x axis represents the isoelectric

point (pI). The y axis represents the molecular mass (kDa), as determined by a commercial gel marker (Invitrogen™ BenchMark™ Protein Ladder). **B** Heat map representation of the protein expression in the evolutionary stages of the *L. braziliensis* parasite

protein has spacers, which help it to be soluble and ensure more space between epitopes, thereby facilitating antibody binding. The 6XHis-Tag was added to the gene, aiming to ensure the affinity of the protein for nickel present in the purification column as binds to the column resin for posterior purification (Fig. 3B). The immunoinformatics analysis of the chimeric protein showed a score of 0.91 for unstructured regions and a score of 1.74 for linear B-cell epitopes.

ELISA assays employing rChIP showed high performance in the diagnosis of the HTL as compared to SLb-Antigen ELISA and IFA kit

The performance of each assay is summarized in Fig. 4 and Table 3. In this sense, when all assays were compared, rChIP ELISA was able to recognize all positive samples for TL (CL + ML = 70 patients) and showed 100.00% sensitivity (95% CI: 94.87–100.00). A 64.29% sensitivity was

Table 1 Proteins identified by 2-DE/MS in stages of the *L. braziliensis* parasite and proteins recognized by serum from HTL patients evaluated by immunoproteomic approach

Code	Protein name	TritypDB ID	MW (KDa)	pI	Protein expression		Immunoblot detection in HTL patients	
					Promastigote	Amastigote	CL	ML
1	Actin	LbrM.04.1250	21.0	5.11	Present	Present	+	+
2	Heat shock protein 83-1	LbrM.33.0330	41.4	4.66	Present	Present	+	+
3	Eukaryotic initiation factor 5a, putative	LbrM.25.0580	17.8	4.62	Present	Present	+	+
4	Paraflagellar rod protein 1D	LbrM.31.0160	69.3	5.21	Absent	Present	+	+
5	Cytochrome oxidase subunit IV, putative	LbrM.12.0670	39.1	5.96	Present	Present	+	+
6	MORN repeat-containing protein 1	LbrM.30.3350	40.9	5.45	Present	Present	+	+
7	Translation elongation factor 1-beta, putative	LbrM.35.1570	23.0	4.32	Absent	Present	+	+
8	Tryparedoxin peroxidase	LbrM.15.1100	22.6	6.51	Absent	Present	+	+

Abbreviations: *MW*, predicted molecular weight; *pI*, predicted isoelectric point; *CL*, cutaneous leishmaniasis; *ML*, mucosal leishmaniasis

found for SLb-Antigen ELISA (95% CI: 51.93–75.39%; twenty-five false negatives for CL + ML), while the IFA kit showed the value of 31.42% (95% CI: 20.85–43.63%; forty-eight false negatives for CL + ML). Thus, the maximum PPV was achieved by *r*ChiP ELISA (100.00%),

followed by SLb-Antigen ELISA (65.215) and the IFA kit (35.48%).

To further evaluate the diagnostic specificity of the tests, sera from control individuals or patients with Chagas disease (CD) were tested. *r*ChiP ELISA showed the higher

Table 2 Sequence identity and similarity of the linear B-cell epitopes identified in *L. braziliensis* proteins selected by immunoproteomic with orthologs in *T. cruzi* and *H. sapiens*

Protein name	TritypDB ID	Epitope	Amino acids sequence	<i>T. Cruzii</i> /CL Brener		<i>H. sapiens</i>	
				Identity	Similarity	Identity	Similarity
Actin	LbrM.04.1250	1	TNSAKSANE	57.0%	68.8%	56.6%	67.7%
		2	SEEEKKQREE	90.0%	100.0%	80.0%	80.0%
Heat shock protein 83-1	LbrM.33.0330	3	EDEEVAEAPPAAEAPAEVTAG	47.6%	47.6%	45.5%	63.6%
		4	HDFSHQGGGDNASK	35.7%	50.0%	42.8%	60.0%
Eukaryotic initiation factor 5a, putative	LbrM.25.0580	5	LEDQAPST	65.0%	65.0%	65.0%	65.0%
		6	EGESREDLDMPPDPAL	52.5%	65.0%	62.5%	68.7%
		7	MSPEDATG	65.0%	65.0%	57.5%	57.5%
Paraflagellar rod protein 1D	LbrM.31.0160	8	QANQETSQM	100.0%	100.0%	66.6%	66.6%
		9	ATKRYTGNER	62.7%	62.7%	53.6%	62.7%
		10	FNGEPPSW	87.5%	87.5%	75.0%	75.0%
Cytochrome oxidase subunit IV, putative	LbrM.12.0670	11	KAGTGPDAEKS	63.3%	72.7%	72.7%	72.7%
		12	GGSPNSL	100.0%	100.0%	85.7%	85.7%
		13	GSKYDGE	85.7%	85.7%	85.7%	85.7%
		14	GDRYDGEWK	100.0%	100.0%	86.0%	100.0%
MORN repeat-containing protein 1	LbrM.30.3350	15	DRYEGEWKDDKRHG	92.9%	100.0%	64.3%	78.5%
		16	VTYAGPDGSVSEK	0.0%	0.0%	61.1%	61.1%
		17	VYEGEWQD	85.7%	100.0%	63.0%	100.0%
		18	KDTYEGEWRNDSAT	57.1%	61.5%	50.0%	61.5%
		19	KKVAAPAPAAAAAADD	78.7%	78.7%	68.5%	68.5%
Translation elongation factor 1-beta, putative	LbrM.35.1570	20	AKDAEKKKT	57.7%	57.7%	67.0%	67.0%
		21	KMNEPAPPF	66.0%	66.0%	66.6%	66.6%
Tryparedoxin peroxidase	LbrM.15.1100	22	WKKGDATMKPE	57.1%	57.1%	64.3%	64.3%

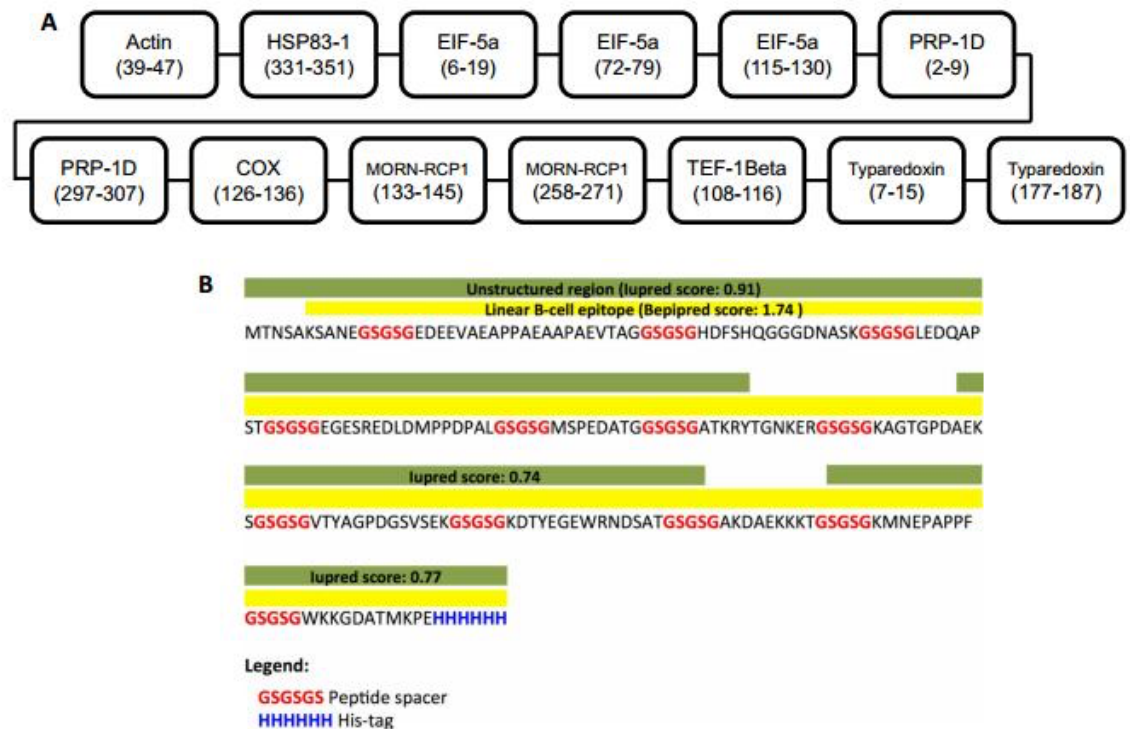


Fig. 3 **A** B-cell epitopes used in the construction of the chimeric gene. **B** Representation of the chimeric protein generated by immunoinformatics with predicted scores of an unstructured region, B-cell epitopes, peptide spacer, and His-Tag

specificity value (100.00%, 95% CI: 94.87–100.00%), followed by SLb-Antigen ELISA (65.71%, 95% CI: 53.40–76.65%; twenty-four false positives for CT + CD) and the IFA kit (42.85%, 95% CI: 31.09–55.25%; forty false positives for CT + CD). Maximum NPV values were observed for *r*ChiP ELISA (100.00%), followed by SLb-Antigen ELISA (64.78%) and the IFA kit (38.46%).

The agreement (Kappa index, κ) between the *r*ChiP (ELISA), SLb-Antigen (ELISA), and IFA kit with the parasitological assays (direct method) is shown in Table 3. *r*ChiP ELISA displayed the best agreement value of all tests, with a perfect concordance in comparison to parasitological assays ($\kappa = 1.00$, 95% CI: 1.00–1.00). Fair agreement was observed for SLb-Antigen ELISA ($\kappa = 0.30$,

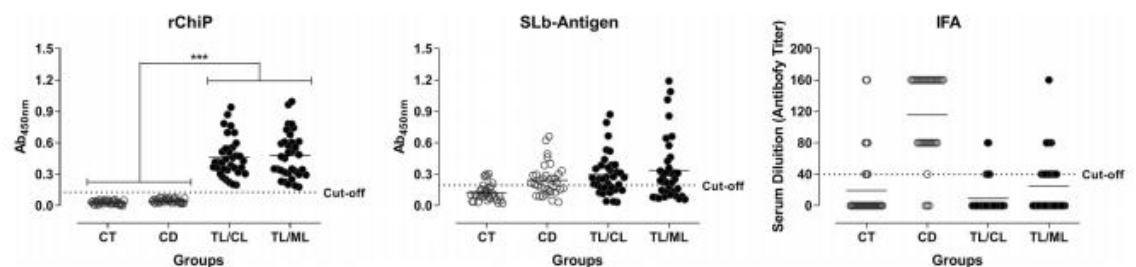


Fig. 4 Comparison of reactivity from *r*ChiP ELISA, SLb-Antigen ELISA, and IFA kit. Negative groups for HTL (white circle): control (CT) and Chagas disease (CD) groups. Positive groups for HTL (black circle): cutaneous (TL/CL) and mucosal leishmaniasis (TL/ML). Differences were considered statistically significant at

*** $p < 0.001$ (highlighted by connecting lines). Cut-offs for *r*ChiP and SLb-Antigen ELISA were determined by ROC curves (optical density at 450 nm ≥ 0.128 and ≥ 0.196 , respectively). Cut-offs for the IFA kit were determined by the manufacturer's instructions (antibody titer ≥ 40)

Table 3 Measure of diagnostic performance for *r*ChiP ELISA, SLb-Antigen ELISA, and IFA kit

Parameters ^a	Diagnostic test		
	Chimeric protein*	SLb-Antigen*	IFA**
TP	70	45	22
TN	70	46	30
FP	0	24	40
FN	0	25	48
Se (%)	100.00	64.29	31.42
Se-CI 95%	94.87 to 100.00	51.93 to 75.39	20.85 to 43.63
Sp (%)	100.00	65.71	42.85
Sp-CI 95%	94.87 to 100.00	53.40 to 76.65	31.09 to 55.25
PPV (%)	100.00	65.21	35.48
NPV (%)	100.00	64.78	38.46
AC (%)	100.00	65.00	37.14
κ	1.00	0.30	-0.26
κ -CI 95%	1.00 to 1.00	0.14 to 0.46	-0.42 to -0.09
Agreement ^b	Perfect	Fair	No agreement

^aParameters were calculated using all samples presented in this work: negative (CT + CD, $n = 70$) and positive for Tegumentary Leishmaniasis (TL/CL + TL/ML, $n = 70$)

^bAgreement was calculated using parasitological assays as gold standard test

*Cut-off obtained by ROC curve

**Cut-off obtained by the manufacturer

Abbreviations: SLb-Antigen, soluble *Leishmania braziliensis* antigen; IFA, immunofluorescence; TP, true positive; TN, true negative; FP, false positive; FN, false negative; Se, sensitivity; Sp, specificity; CI, confidence interval; PPV, predictive positive value; PPN, predictive negative value; AC, accuracy; κ , kappa index

95% CI: 0.14–0.46). When evaluating the IFA kit, no significant agreement was observed ($\kappa = -0.26$, 95% CI: -0.42 to -0.09) with parasitological assays.

In summary, in the ELISA assays employing a soluble *Leishmania* extract (SLb-Antigen) and the IFA kit, the results for patients with CD and CT showed cross-reactions, as they presented no good separation in TL groups. Similarly, some positive samples of patients with the CL and ML forms tested negative to the test using the same antigen. By contrast, when using the *r*ChiP antigen, a separation of negative patients was observed, with no cross-reactions, presenting an excellent separation of positive patients for both the cutaneous and mucosal forms. In addition, the CL and ML patients showed high values for specific antibodies against *r*ChiP when compared to all non-infected groups (CT and CD, $p < 0.001$), while significant increases were found only when compared to CT and CD groups for the SLb-Antigen (ELISA) and the IFA kit (Fig. 4).

Discussion

HTL, which is caused by several pathogens of the *Leishmania* genus, consists of an important public health problem in several parts of the world, with an increase in its incidence, which has mostly occurred over the last decades (Goto and Lindoso 2010). Diagnosis is made by associating clinical and epidemiological inquiries with laboratory tests. Concerning laboratory tests, none of the available assays can be considered the gold standard, as they do not have satisfactory accuracy for disease detection (Gomes et al. 2014b). Currently, MST, an essential test to assist infectologists in the clinical management of patients, is unavailable in Brazil. Thus, there is an urgent need to discover new antigens for the development of diagnostic tests with high-quality, low cost, and easy to perform serological test, which will contribute to improving the diagnosis of HTL and, consequently, identifying the number of cases to allow the use of prevention, treatment, and control in endemic areas of disease. In this sense, the identification of new targets for diagnosis is an important step in the development of biotechnology products. The high failure rate is generally attributed to inadequate target selection (Boggild et al. 2010; Schubach et al. 2001; Weigle et al. 1987). Serological diagnosis using recombinant antigens has been implemented in laboratory routines. However, HTL diagnosis has still left some questions about which is the best antigen and/or method (Cunningham et al. 2012; Sato et al. 2017).

The present study aimed to develop a chimeric protein based on linear B-cell epitopes present in proteins, from *L. braziliensis*, previously identified by the immunoproteomics approach (Duarte et al. 2015). In Brazil, *L. braziliensis* is a parasite of great importance, as it is responsible for the majority of HTL cases, mainly in Minas Gerais, this study's location of coverage. This information justifies the robust proteomic and bioinformatics approach of the *L. braziliensis* in addition to the clinical spectrum of patients included in the study. The first strategy was to select proteins that were expressed in the amastigote stage and identified by mass spectrometry. Proteins expressed in the stages found in the vertebrate host, in this case, amastigote, can guarantee greater exposure to the immune system. In this example, this exposure can trigger a strong humoral response that can be detected by several serological methods based on the production of specific antibodies. Here, we showed that all of the selected proteins were highly expressed in the amastigote stage. This fact can be explained by the strong humoral immune response detected by *r*ChiP ELISA ($p < 0.001$), as compared to ELISA, which employed a mixture of the soluble antigens presented in SLb-Antigen, which may contain many

proteins with low affinity for antibodies produced by B-cells (Carvalho et al. 2018; Elisei et al. 2018). Previous works have established that proteins expressed in evolutive stages found in the vertebrate host are possibly associated with the infectivity process and/or the intracellular survival of the pathogen within the host and maybe interesting targets (Carvalho et al. 2018; Elisei et al. 2018). In addition, some proteins have been previously identified as potential virulence factors to *Leishmania* parasites, as described for trypanothione peroxidase (Kima 2014; Walker et al. 2006), heat shock protein 83 (Larreta et al. 2004; Salotra et al. 1994), and elongation factor 1 (Nandan et al. 2002; Walker et al. 2006).

Beginning with previously identified amastigote proteins, the next strategy was to evaluate, through the immunoproteomic approach, which targets are simultaneously recognized by samples from HTL patients (CL and ML) and not recognized by CT and CD patients. For this, western blotting assays were performed, using serum from subjects clinically characterized and diagnosed by direct methods, to select protein spots that can guarantee high sensitivity to detect the clinical spectrum of HTL caused by *L. braziliensis*. It is well-known that *Leishmania*-infected patients have low antibody production to the antigens from these parasites (Duarte et al. 2015). Thus, all CL and ML patients were recognized in ELISA assay employing rChiP. To obtain high specificity values simultaneously to the identification of HTL patients, western blot assays were performed with serum from CT and CD patients. This step allowed for the exclusion of unspecific proteins that could result in cross-reactivity, thus leading to false-positive results. Therefore, from these analyses, eight proteins were selected to continue the identification of targets to compose the chimeric protein.

Adding to the previous strategy, an *in silico* prediction of epitopes was performed, as was an evaluation of intrinsically unstructured/disordered regions (IURs) in proteins. In this work, sensitivity problems of target proteins can be improved: first, by the identification of the B-cell epitopes with a high score, and second, by divergence analysis of these regions with targets present in the host to exclude sequences with high similarity to self-antigens (Carvalho et al. 2018; Elisei et al. 2018). The choice of B-cell epitopes in regions of structural disorder, a condition that excludes conformational epitopes, enables the production of a multi-antigenic protein separate from the three-dimensional structure, a relevant limitation described in obtaining recombinant proteins in heterologous systems (Duarte et al. 2015; Menezes-Souza et al. 2015b). In this step, we initially identified twenty-two B-cell epitopes. However, after a bioinformatics analysis of the epitope's identity and similarity with orthologous sequences from *T. cruzi* and *H. sapiens*, nine epitopes were excluded due to their high level of conservation when compared to *L. braziliensis* proteins. The

remaining thirteen epitopes were selected to be included in the chimeric protein. In fact, rChiP was able to detect infection, even when antibody titration was low, a fact that frequently occurs in CL when cell response is more effective.

In this context, the initial strategy of protein selection, through immunoproteomic analysis, included samples from patients with clinical manifestations from simple cutaneous to severe mucosal leishmaniasis. The objective is precisely to contemplate all the spectrums of the disease, according to the species of parasite found in the region under study, which in this case, the state of Minas Gerais, Brazil. In fact, when analyzing the ELISA data of patients in the CL and ML groups, using the total soluble antigen of *L. braziliensis*, we observed that the absorbance levels between the samples will vary from 0.034–0.872 among the patients in the CL group and from 0.162–1.090 in the ML group. These data correspond to a variation of approximately 25.6 and 6.7 times between the samples tested, respectively. Similar data were observed by the immunofluorescence technique (IFA), using promastigotes of the parasite, where there is a variation in antibody titers from 0–80 for the CL group and from 0–160 for the ML group. This analysis indicated that we are contemplating patients with low and high levels of specific antibodies for the parasite, as described previously (Duarte et al. 2015). In addition, the selection of those epitopes decreases the chance of the occurrence of cross-reactions, which is a major problem in HTL diagnoses (Cataldo et al. 2010; Gomes-Silva et al. 2008; Kalter 1994; Vexenat Ade et al. 1996), as observed in SLB-Antigen ELISA or IFA kit assays performed in this study. In agreement, studies that used divergent proteins with hosts and other microorganisms that occur in endemic areas have shown increased diagnostic parameters, such as sensitivity and specificity, when compared to the use of other recombinant proteins (Aguirre et al. 2006; Marcipar et al. 2005).

The high conservation of proteins among the various *Leishmania* species, due to phylogenetic proximity, associated with high divergent from the orthologous proteins from human hosts and from *T. cruzi*, opens the possibility for identification of an antigen able to simultaneously diagnose the various clinical forms of the disease (Coelho et al. 2012; Souza et al. 2013). We have recently started research to verify this hypothesis, employing other species prevalent in Brazil, such as *L. amazonensis*, also associated with HTL in other regions of the country, and also for *L. infantum*, associated with human visceral leishmaniasis (HVL) and widely distributed in various regions of the country. Preliminary results (data not shown) evaluating samples from patients with HVL suggest a potential use for diagnosing the disease. This strategy is particularly interesting because the clinical manifestations are very different between HTL and HVL, and as diseases can co-occur in the same region, the association of clinical data with a positive result for ELISA

using rChiP allows the confirmatory diagnosis of the disease (Mendes et al. 2013; Menezes-Souza et al. 2015b).

In conclusion, the rational strategy used in this work was successful in developing antigens to be used in immunological assays (100.0% sensitivity and specificity) in the detection of CL and ML cases, which excluded the occurrence of false-positive results in healthy individuals and in patients with Chagas disease, commonly associated with cross-reactivity with *Leishmania* species in endemic areas. The present technology also opens the door to future investment in its use in field exams by means of an immunochromatographic test, which will be even more helpful in regions where laboratory structures are unavailable or scarce.

Acknowledgements MCD, TAOM, EAF, and DM-S wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, for their fellowships.

Author contribution DM-S and TAOM conceived and designed research. GCG, AMRS, MCD, MFCS, FAFM, and DMMF conducted experiments. DM-S, EAF, and DTG contributed new reagents or analytical tools. DM-S, TAOM, GCG, and MCD performed result interpretation and data analysis. GCG and DM-S wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Funding This work was supported by grants from PRPq/UFMG (87-05/2016), CAPES (23038.004862/2015-74), FAPEMIG (APQ-03599-18 and APQ-03821-18), and CNPq (309939/2016-0, 408408/2016-2, 311426/2019-0, and 313070/2018-0).

Data availability The authors declare that (the/all other) data supporting the findings of this study are available within the article (and its supplementary information files).

Declarations

Ethical approval The use of human samples was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil (protocol CAAE-32343114.9.0000.5149). All patients received an individual copy of the study policy, which was reviewed by an independent person, and all participants signed an informed consent form, in Portuguese, before blood collection. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Aguirre S, Silber AM, Brito ME, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS (2006) Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *J Clin Microbiol* 44:3768–3774
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Team WHOLC (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 7:e35671

- Ameen M (2010) Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol* 35:699–705
- Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, Depledge DP, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gardner MJ, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Hertz-Fowler C, Houston R, Innamorato F, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer E, Li W, Logan FJ, Miller JA, Mitra S, Myler PJ, Nayak V, Pennington C, Phan I, Pinney DF, Ramasamy G, Rogers MB, Roos DS, Ross C, Sivam D, Smith DF, Srinivasamoorthy G, Stoeckert CJ Jr, Subramanian S, Thibodeau R, Tivey A, Treatman C, Velarde G, Wang H (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* 38:D457–462
- Boggild AK, Ramos AP, Espinosa D, Valencia BM, Veland N, Miranda-Verastegui C, Arevalo J, Low DE, Llanos-Cuentas A (2010) Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 83:345–350
- Braga Lde S, Navasconi TR, Leatte EP, Skraba CM, Silveira TG, Ribas-Silva RC (2015) Presence of anti-*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* antibodies in blood donors in the west-central region of the state of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 48:622–625
- Carvalho A, Mendes TAO, Coelho EAF, Duarte MC, Menezes-Souza D (2018) New antigens for the serological diagnosis of human visceral leishmaniasis identified by immunogenomic screening. *PLoS One*. 13:e0209599
- Cataldo JJ, de Queiroz Mello FC, Mouta-Confort E, de Fatima MM, de Oliveira SA, da Silva GM, Ribeiro FC, de Fatima M-V, Passos SR (2010) Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *J Clin Lab Anal* 24:289–294
- Coelho VT, Coelho VT, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, Soto M, Santoro MM, Tavares CA, Fernandes AP, Coelho EA (2012) Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 6:e1430
- Cunningham J, Hasker E, Das P, El Safi S, Goto H, Mondal D, Mbuchi M, Mukhtar M, Rabello A, Rijal S, Sundar S, Wasunna M, Adams E, Menten J, Peeling R, Boelaert M, WHO, TDR Visceral Leishmaniasis Laboratory Network. (2012) A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 55:1312–1319
- de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M (2003) Leishmanial infection: analysis of its first steps. *A Review Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:861–870
- de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque SD, Tavares DDC, Brelaz-de-Castro MCA, Silva RDE, Pereira VRA. 2015. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell and Bioscience* 5
- Diniz JL, Costa MO, Gonçalves DU (2011) Mucocutaneous leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. *Braz J Otorhinolaryngol* 77(3):380–384
- 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, Coelho EA (2015) Proteins selected in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 22:1187–1196
- Elisei RMT, Matos CS, Carvalho AMRS, Chaves AT, Medeiros FAC, Barbosa R, Marcelino AP, Dos Santos EK, Coelho EAF, Duarte MC, de Oliveira Mendes TA, da Costa Rocha MO,

- Menezes-Souza D (2018) Immunogenomic screening approach to identify new antigens for the serological diagnosis of chronic Chagas' disease. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:6069–6080
- Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, Belli A, Favoreto Junior S, Ferreira MS (2008) Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:135–141
- Gomes CM, de Paula NA, Cesetti MV, Roselino AM, Sampaio RN (2014a) Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis*-endemic area. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79:413–418
- Gomes CM, Paula NA, Moraes OO, Soares KA, Roselino AM, Sampaio RN (2014b) Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol* 89:701–709
- Goto H, Lindoso JA (2010) Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8:419–433
- Grimaldi G Jr, Tesh RB (1993) Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6:230–250
- Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D (1989) A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 41:687–725
- Guimaraes MC, Celeste BJ, Franco EL (1990) Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull World Health Organ* 68:39–43
- Hailu A (2002) The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42:251–256
- Hanley JA, McNeil BJ (1983) A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 148:839–843
- Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Santa da Silva J, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A (2004) *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect* 6:977–984
- Kalter DC (1994) Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis. *Dermatol Clin* 12:37–50
- Kima PE (2014) *Leishmania* molecules that mediate intracellular pathogenesis. *Microbes Infect* 16:721–726
- Larreta R, Soto M, Quijada L, Folgueira C, Abanades DR, Alonso C, Requena JM (2004) The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. *BMC Mol Biol* 5:3
- Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhaes PA, Mayrink W (2005) Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99:55–61
- Malchiodi EL, Chiaramonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA (1994) Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.*: use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clin Exp Immunol* 97:417–423
- Marcipar IS, Roodveldt C, Corradi G, Cabeza ML, Brito ME, Winter LM, Marcipar AJ, Silber AM (2005) Use of full-length recombinant calflagin and its C fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol* 43:5498–5503
- Marsden PD (1986) Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80:859–876
- Marzochi MC, Marzochi KB (1994) Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10(Suppl 2):359–375
- Maurer MH (2016) Two-dimensional gel electrophoresis image analysis via dedicated software packages. *Methods Mol Biol* 1384:55–65
- Mendes TA, Reis Cunha JL, de Almeida Lourdes R, Rodrigues Luiz GF, Lemos LD, dos Santos AR, da Câmara AC, Galvão LM, Bern C, Gilman RH, Fujiwara RT, Gazzinelli RT, Bartholomeu DC (2013) Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2524
- Menezes-Souza D, Mendes TA, Gomes Mde S, Bartholomeu DC, Fujiwara RT (2015) Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin B-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e3426
- Menezes-Souza D, de Oliveira Mendes TA, de Araujo Leao AC, de Souza GM, Fujiwara RT, Bartholomeu DC (2015b) Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from *Leishmania braziliensis*: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1323–1336
- Menezes-Souza D, Mendes TA, Nagem RA, Santos TT, Silva AL, Santoro MM, de Carvalho SF, Coelho EA, Bartholomeu DC, Fujiwara RT (2014) Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *PLoS One* 9:e99216
- Nandan D, Yi T, Lopez M, Lai C, Reiner NE (2002) *Leishmania* EF-1 α activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *J Biol Chem* 277:50190–50197
- Obuchowski NA, McClish DK (1997) Sample size determination for diagnostic accuracy studies involving binormal ROC curve indices. *Stat Med* 16:1529–1542
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7:581–596
- Salles BC, Costa LE, Alves PT, Dias AC, Vaz ER, Menezes-Souza D, Ramos FF, Duarte MC, Roatt BM, Chavez-Fumagalli MA, Tavares CA, Gonçalves DU, Rocha RL, Goulart LR, Coelho EA (2017) *Leishmania infantum* mimotopes and a phage-ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 87:219–225
- Salotra P, Ralhan R, Bhatnagar R (1994) Differential expression of stress proteins in virulent and attenuated promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biochem Mol Biol Int* 33:691–697
- Saravia NG, Holguin AF, McMahon-Pratt D, D'Alessandro A (1985) Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Am J Trop Med Hyg* 34:714–720
- Sarkari B, Ashrafmansouri M, Hatam G, Habibi P, Abdolahi Khabisi S (2014) Performance of an ELISA and indirect immunofluorescence assay in serological diagnosis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2014:505134
- Sato CM, Sanchez MC, Celeste BJ, Duthie MS, Guderian J, Reed SG, de Brito ME, Campos MB, de Souza Encarnação HV, Guerra J, de Mesquita TG, Pinheiro SK, Ramasawmy R, Silveira FT, de Assis SM, Goto H (2017) Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different *Leishmania* species. *J Clin Microbiol* 55:495–503
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
- Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araújo ML, Souza WJ, Haddad F, Perez Mde

- A, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, de Almeida Marzochi MC, Marzochi KB, da Costa SC (2001) Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:987–996
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:239–251
- SINAN (2018). Sistema de Informação de Agravos de Notificação
- Sotto MN, Yamashiro-Kanashiro EH, da Matta VL, de Brito T (1989) Cutaneous leishmaniasis of the new world: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Trop* 46:121–130
- Souza AP, Soto M, Costa JM, Boaventura VS, de Oliveira CI, Cristal JR, Barral-Netto M, Barral A (2013) Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PLoS One*. 8:e66110
- Srivastava APD, Mehrotra S, Sundar S (2010) Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1:6
- Sundar S, Rai M (2002) Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:951–958
- Team RC (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing
- Vexenat Ade C, Santana JM, Teixeira AR (1996) Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38:177–185
- Walker J, Acestor N, Gongora R, Quadroni M, Segura I, Fasel N, Saravia NG (2006) Comparative protein profiling identifies elongation factor-1beta and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. *Mol Biochem Parasitol* 145:254–264
- Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Huber W, Liaw A, Lumley T, Maechler M, Magnusson A, Moeller S, Schwartz M, Venables B (2020). gplots: various R programming tools for plotting data. R package version 3.0.4. ScienceOpen
- Weigle KA, de Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A (1987) Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg* 36:489–496

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

8. CONCLUSÃO

A presente tecnologia apresenta potencial para ser utilizada no diagnóstico da LTH, uma vez que mostrou ótimos resultados separando soros de pacientes negativos e positivos para LTH. A presente tecnologia ainda abre portas para a criação de testes para serem realizados a campo, como os ensaios imunocromatográficos que são de grande ajuda em regiões onde a doença é endêmica e não há estrutura laboratorial para realização de outros tipos de exame.

9. PERSPECTIVAS

- Incluir no artigo em preparação, análises de expressão dos alvos nos estágios evolutivos, bem como, análise da antigenicidade por meio da técnica de *Western-blot*;
- Análise de identidade e similaridade com proteínas do parasito *L. infantum*, para posteriormente avaliar o emprego no sorodiagnóstico das Leishmanioses visceral humana (LVH) e canina (LVC);
- Submissão de uma patente junto ao CTIT da UFMG sobre o potencial uso da proteína quimérica no diagnóstico sorológico da LTH, LVH e LVC;
- Testar a nova tecnologia com soros de pacientes a campo, que não estejam bem caracterizados, a fim de prosseguir com a validação do teste para uso a campo.

10. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO

- Apresentação do trabalho “Identification and validation of antigens for serological diagnosis of tegumentary leishmaniasis using identified targets as virulence factors of the parasite *Leishmania braziliensis*” no 53º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, realizado em Cuiabá, 2017.
- Apresentação do trabalho “Identificação e validação de antígenos para diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar utilizando alvos identificados como fatores de virulência do parasito *Leishmania braziliensis*”, na Semana do Conhecimento da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2017.
- Apresentação do trabalho “Epitope mapping of the TPR-Lb protein discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary form of leishmaniasis” no XXV Congresso Brasileiro de Parasitologia, Búzios-RJ, 2017.
- Apresentação do trabalho “Development of chimeric protein for application in diagnosis of human tegumentary leishmaniasis”, no 53º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Cuiabá-MT, 2017.
- Apresentação do trabalho “Development of chimeric protein for application in diagnosis of human tegumentary leishmaniasis” no 3º Encontro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Belo Horizonte-MG, 2017.
- Apresentação do trabalho “Desenvolvimento de proteína quimérica para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar humana” na Semana do Conhecimento da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2017.
- Apresentação do trabalho “A hypothetical protein identified by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis application for cutaneous and mucosal leishmaniasis” no XXV Congresso Brasileiro de Parasitologia, Búzios-RJ, 2017.

- Apresentação do trabalho “New antigens for the serological diagnosis of human visceral leishmaniasis identified by immunogenomic screening” no V Scientific Congress of the Post-Graduation Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte-MG, 2018.
- Apresentação do trabalho “Evaluation of a chimeric protein developed for diagnostic of human tegumentary leishmaniasis as candidate for diagnosis of human visceral leishmaniasis” no IV Scientific Congress of the Post-Graduation Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine, Faculdade de Medicina, UFMG em Belo Horizonte-MG, 2018.
- Apresentação do trabalho “Development of a vaccine for cutaneous leishmaniasis based on a multiepitope immunogen” no V Scientific Congress of the Post-Graduation Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine, Faculdade de Medicina, UFMG em Belo Horizonte-MG, 2018.
- Apresentação do trabalho “Development of a chimeric protein based on B cell epitopes for diagnostic of human tegumentary leishmaniasis” no IV Scientific Congress of the Post-Graduation Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine, Faculdade de Medicina, UFMG em Belo Horizonte-MG, 2018.
- Apresentação do trabalho “Desenvolvimento de uma proteína quimérica multiepítipo de linfócitos B para uso como antígeno no diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar humana” na XXVII Semana do Conhecimento da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte-MG, 2018.
- Apresentação do trabalho “Desenvolvimento de um gene codificador de uma proteína quimérica contendo multiepítipos de linfócitos B, identificados por imunoproteômica, para uso como antígeno no diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar humana” no VIII Seminário de Iniciação Científica Júnior da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte-MG, 2018.

- Apresentação do trabalho “Avaliação de uma proteína quimérica multiepítopo de linfócito B como potencial antígeno para diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar” no VIII Seminário de Iniciação Científica Júnior da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte-MG, 2018.
- Apresentação do trabalho “Development of a chimeric protein based on proteomic approach to identify new antigens for the serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis” no 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, em Belo Horizonte-MG, 2019.
- Apresentação do trabalho “Desenvolvimento de uma proteína quimérica multiepítopo de linfócitos B para uso como antígeno no diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar humana (LTH)” na XXVIII Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.
- Publicação do resumo intitulado “Development of a chimeric protein based on proteomic approach to identify new antigens for the serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis” nos anais do 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, , em Belo Horizonte-MG, 2019.
- Publicação do resumo intitulado “Development of chimeric protein for application in diagnosis of human tegumentary leishmaniasis” nos anais do 53º MedTrop, em Cuiabá-MT, em 2017.
- Apresentação do trabalho “Development of a chimeric protein based on B cell epitopes for diagnostic of human tegumentary leishmaniasis. 2018.”
- Menção Honrosa concedida pela Universidade Federal de Minas Gerais, 2017 pela apresentação do trabalho intitulado “Development of chimeric protein for application in diagnosis of human tegumentary leishmaniasis” no 3º Encontro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Belo Horizonte-MG.

- Premiação de primeiro lugar na categoria “Rapid Fire Presentation” pela apresentação do trabalho intitulado “Development of a chimeric protein based on B cell epitopes for diagnostic of human tegumentary leishmaniasis” no IV Scientific Congress of the Post-Graduation Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine, Faculdade de Medicina, UFMG em Belo Horizonte-MG, 2018.

11. REFERÊNCIAS

AGUIRRE, S.; SILBER, A. M.; BRITO, M. E.; RIBONE, M. E. *et al.* Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. **J Clin Microbiol**, 44, n. 10, p. 3768-3774, Oct 2006.

ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, 17, n. 1, p. 1-18, Mar 2003.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, 7, n. 5, May 31 2012.

ANTHONY, R. L.; GROGL, M.; SACCI, J. B.; BALLOU, R. W. Rapid Detection of *Leishmania* Amastigotes in Fluid Aspirates and Biopsies of Human-Tissues. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 37, n. 2, p. 271-276, Sep 1987.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, 30, n. 12-13, p. 1269-1281, Nov 2000.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BOURDEAU, P. *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, 24, n. 7, p. 324-330, Jul 2008.

BARRAL, A.; ALMEIDA, R. P.; DE JESUS, A. R.; MEDEIROS NETO, E. *et al.* The relevance of characterizing *Leishmania* from cutaneous lesions. A simple approach for isolation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 82, n. 4, p. 579, Oct-Dec 1987.

BARROSO-FREITAS, A. P.; PASSOS, S. R.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M. F. *et al.* Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 103, n. 4, p. 383-389, Apr 2009.

BARSKY, S.; STORINO, W.; SALGEA, K.; KNAPP, D. P. Cutaneous Leishmaniasis - Surgical Management of a Case with Unusual Clinical and Histological Features. **Archives of Dermatology**, 114, n. 9, p. 1354-1355, 1978.

BENSOUSSAN, E.; NASEREDDIN, A.; JONAS, F.; SCHNUR, L. F. *et al.* Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, 44, n. 4, p. 1435-1439, Apr 2006.

BIVONA, A. E.; CZENTNER, L.; ALBERTI, A. S.; CERNY, N. *et al.* Recombinant Cysteine Proteinase B from *Leishmania braziliensis* and Its Domains: Promising Antigens for

Serodiagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, 57, n. 11, Nov 2019.

BOGGILD, A. K.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; ESPINOSA, D.; AREVALO, J. *et al.* Evaluation of a microculture method for isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. **Journal of Clinical Microbiology**, 45, n. 11, p. 3680-3684, Nov 2007.

BOGGILD, A. K.; RAMOS, A. P.; ESPINOSA, D.; VALENCIA, B. M. *et al.* Clinical and Demographic Stratification of Test Performance: A Pooled Analysis of Five Laboratory Diagnostic Methods for American Cutaneous Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 83, n. 2, p. 345-350, Aug 2010.

BROTHERTON, M. C.; RACINE, G.; FOUCHER, A. L.; DRUMMELSMITH, J. *et al.* Analysis of stage-specific expression of basic proteins in Leishmania infantum. **J Proteome Res**, 9, n. 8, p. 3842-3853, Aug 6 2010.

BUGYI, B.; CARLIER, M. F. Control of Actin Filament Treadmilling in Cell Motility. **Annual Review of Biophysics**, Vol 39, 39, p. 449-470, 2010.

CACHON, J.; CACHON, M.; COSSON, M. P.; COSSON, J. The Paraflagellar Rod - a Structure in Search of a Function. **Biology of the Cell**, 63, n. 2, p. 169-181, 1988.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; BITTENCOURT, A. *et al.* Clinical and Immunopathological Aspects of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis. **Acta Tropica**, 56, n. 4, p. 315-325, Apr 1994.

CATALDO, J. I.; DE QUEIROZ MELLO, F. C.; MOUTA-CONFORT, E.; DE FATIMA MADEIRA, M. *et al.* Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious Leishmania (Viannia) braziliensis. **J Clin Lab Anal**, 24, n. 5, p. 289-294, 2010.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H. *et al.* Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, 5, n. 11, p. 873-882, Nov 2007a.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, 5, n. 11, p. 873-882, Nov 2007b.

CIMERMAN, B. C., Sérgio. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. São Paulo: Atheneu, 2010. 402 p. 9788573791402.

COELHO, E.A.F et al. Immune responses induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. **Infection and Immunity**. v. 71, n. 7, p. 3988- 94, 2003.

COELHO, V. T. S.; OLIVEIRA, J. S.; VALADARES, D. G.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A. *et al.* Identification of Proteins in Promastigote and Amastigote-like Leishmania Using an Immunoproteomic Approach. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 6, n. 1, Jan 2012.

COSTA DUARTE, M.; DOS REIS LAGE, L. M.; LAGE, D. P.; MESQUITA, J. T. *et al.* An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against Leishmania species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. **Vet Parasitol**, 217, p. 81-88, Feb 15 2016.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; REIS, L. E. *et al.* Prevalence and Risk Factors Associated with Infection by Leishmania Infantum in Dogs from an Urban Area of Brazil Identified by Molecular Methods. **Journal of Epidemiology and Community Health**, 65, p. A360-A360, Aug 2011.

CUERVO, P.; DE JESUS, J. B.; SABOIA-VAHIA, L.; MENDONCA-LIMA, L. *et al.* Proteomic characterization of the released/secreted proteins of Leishmania (Viannia) braziliensis promastigotes. **Journal of Proteomics**, 73, n. 1, p. 79-92, Nov 2 2009.

CUNNINGHAM, J.; HASKER, E.; DAS, P.; EL SAFI, S. *et al.* A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, 55, n. 10, p. 1312-1319, Nov 15 2012.

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **British Medical Journal**, 326, n. 7385, p. 377-382, Feb 15 2003.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98, n. 7, p. 861-870, Oct 2003.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; DE MORAIS, R. C.; PESSOA, E. S. R.; TRAJANO-SILVA, L. A. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Biosci**, 5, p. 31, 2015.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; DE MORAIS, R. C. S.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L. A. M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell and Bioscience**, 5, Jun 17 2015.

DE SOUZA, L. M. B.; CARVALHO, J.; BATES, M. D.; PETTERLE, R. R. *et al.* Production of a kinesin-related recombinant protein (Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. **One Health**, 8, Dec 2019.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 95, n. 3, p. 239-243, May-Jun 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, 27, n. 5, p. 305-318, Sep 2004.

DEY, R.; MENESES, C.; SALOTRA, P.; KAMHAWI, S. *et al.* Characterization of a *Leishmania* stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence. **Molecular Microbiology**, 77, n. 2, p. 399-414, Jul 2010.

DOS REMEDIOS, C. G.; CHHABRA, D.; KEKIC, M.; DEDOVA, I. V. *et al.* Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. **Physiological Reviews**, 83, n. 2, p. 433-473, Apr 2003.

DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E. *et al.* A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from *Leishmania braziliensis* cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. **Immunobiology**, 222, n. 2, p. 251-260, Feb 2017.

DUARTE, M. C.; LAGE, L. M.; LAGE, D. P.; MARTINS, V. T. *et al.* Treatment of murine visceral leishmaniasis using an 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system. **Parasitol Int**, 65, n. 6 Pt A, p. 728-736, Dec 2016.

DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. *et al.* Proteins Selected in *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**, 22, n. 11, p. 1187-1196, Nov 2015.

DUARTE, M. C.; PIMENTA, D. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHAES, R. D. M. *et al.* Proteins Selected in *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, 22, n. 11, p. 1187-1196, Nov 2015.

EGGER, S. S.; MEIER, S.; LEU, C.; CHRISTEN, S. *et al.* Drug interactions and adverse events associated with antimycotic drugs used for invasive aspergillosis in hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplantation**, 45, n. 7, p. 1197-1203, Jul 2010.

ELISEI, R. M. T.; MATOS, C. S.; CARVALHO, A.; CHAVES, A. T. *et al.* Immunogenomic screening approach to identify new antigens for the serological diagnosis of chronic Chagas' disease. **Appl Microbiol Biotechnol**, May 7 2018.

ESCOBAR, M. A.; MARTINEZ, F.; SMITH, D. S.; PALMA, G. I. American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis (Tegumentary) - a Diagnostic Challenge. **Tropical Doctor**, 22, p. 69-78, 1992.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, 61, p. 243-282, 1999.

FRANKE, E. D.; WIGNALL, F. S.; CRUZ, M. E.; ROSALES, E. *et al.* Efficacy and Toxicity of Sodium Stibogluconate for Mucosal Leishmaniasis. **Annals of Internal Medicine**, 113, n. 12, p. 934-940, Dec 15 1990.

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; ANDRADE, L. R. *et al.* Serological reactivity of different antigenic preparations of Leishmania (Leishmania) amazonensis and the Leishmania braziliensis complex. **Rev Soc Bras Med Trop**, 41, n. 2, p. 135-141, Mar-Apr 2008.

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; ANDRADE, L. R. *et al.* Serological reactivity of different antigenic preparations of Leishmania (Leishmania) amazonensis and the Leishmania braziliensis complex. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, 41, n. 2, p. 135-141, Mar-Apr 2008.

GOMES, C. M.; CESETTI, M. V.; DE PAULA, N. A.; VERNAL, S. *et al.* Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where Leishmania (Viannia) braziliensis Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, 55, n. 2, p. 526-534, Feb 2017.

GOMES, C. M.; DE PAULA, N. A.; CESETTI, M. V.; ROSELINO, A. M. *et al.* Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a L. (V.) braziliensis-endemic area. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 79, n. 4, p. 413-418, Aug 2014.

GOMES, C. M.; DE PAULA, N. A.; DE MORAIS, O. O.; SOARES, K. A. *et al.* Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, 89, n. 5, p. 701-709, Sep-Oct 2014.

GOMES, C. M.; PAULA, N. A.; MORAIS, O. O.; SOARES, K. A. *et al.* Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **An Bras Dermatol**, 89, n. 5, p. 701-709, Sep-Oct 2014.

GONTIJO, B. d. C., M. L. R. **American cutaneous leishmaniasis**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 71-80, 03/2003 2003. Acesso em: 1.

GOPFERT, U.; GOEHRING, N.; KLEIN, C.; ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Molecular cloning and characterization of the *Leishmania mexicana* ppg2 gene encoding the proteophosphoglycans aPPG and pPPG2 that are secreted by amastigotes and promastigotes. **Biochem J**, 344 Pt 3, p. 787-795, Dec 15 1999.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 8, n. 4, p. 419-433, Apr 2010.

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

GRIMALDI, G., Jr.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, 41, n. 6, p. 687-725, Dec 1989. Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

Review.

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

GUBBELS, M. J.; VAISHNAVA, S.; BOOT, N.; DUBREMETZ, J. F. *et al.* A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. **Journal of Cell Science**, 119, n. 11, p. 2236-2245, Jun 1 2006.

GUIMARAES, M. C.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. **Bull World Health Organ**, 68, n. 1, p. 39-43, 1990.

GUIMARAES, M. C. S.; CELESTE, B. J.; FRANCO, E. L. Diagnostic Performance Indexes for Immunofluorescent Tests and Enzyme Immunoassays of Leishmaniasis Sera from Northern and North-Eastern Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, 68, n. 1, p. 39-43, 1990.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and

management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 73, n. 6, p. 911-928, Dec 2015.

HENDERSON, B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. **Cell Biochemistry and Function**, 28, n. 1, p. 1-14, Jan 2010.

HUANG, P. L.; ROBERTS, B. E.; PRATT, D. M.; DAVID, J. R. *et al.* Structure and Arrangement of the Beta-Tubulin Genes of *Leishmania-Tropica*. **Molecular and Cellular Biology**, 4, n. 7, p. 1372-1383, 1984.

KALTER, D. C. Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis. **Dermatol Clin**, 12, n. 1, p. 37-50, Jan 1994.

KAUFMANN, S. H. E. Heat-Shock Proteins and the Immune-Response. **Immunology Today**, 11, n. 4, p. 129-136, Apr 1990.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 9, n. 8, p. 604-615, Aug 2011.

KOUTSONI, O.; BARHOUMI, M.; GUIZANI, I.; DOTSIKA, E. *Leishmania* Eukaryotic Initiation Factor (LeIF) Inhibits Parasite Growth in Murine Macrophages. **Plos One**, 9, n. 5, May 15 2014.

KUMAR, G.; SRIVASTAVA, R.; MITRA, K.; SAHASRABUDDHE, A. A. *et al.* Overexpression of S4D Mutant of *Leishmania donovani* ADF/Cofilin Impairs Flagellum Assembly by Affecting Actin Dynamics. **Eukaryotic Cell**, 11, n. 6, p. 752-760, Jun 2012.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **Academic Press: London**, p. 1-120, 1987.

LUNEDO, S. N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; DE CASTRO, E. A.; TELLES, J. E. Q. Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Acta Histochemica**, 114, n. 3, p. 252-258, 2012.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; RIVAS, L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 51, n. 4, p. 1327-1332, Apr 2007.

MABEY, D.; PEELING, R. W.; USTIANOWSKI, A.; PERKINS, M. D. Diagnostics for the developing world. **Nat Rev Microbiol**, 2, n. 3, p. 231-240, Mar 2004.

MARCIPAR, I. S.; ROODVELDT, C.; CORRADI, G.; CABEZA, M. L. *et al.* Use of full-length recombinant calflagin and its c fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **J Clin Microbiol**, 43, n. 11, p. 5498-5503, Nov 2005.

MARSDEN, P. D. Mucosal Leishmaniasis (Espundia Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 80, n. 6, p. 859-876, 1986.

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad Saude Publica**, 10 Suppl 2, p. 359-375, 1994.

MASUDA, A.; DO NASCIMENTO, S. F.; GUERRA, C. S.; PARANHOS GDA, S. *et al.* Analysis of the specificity of human antibodies to antigens of *Leishmania braziliensis* *braziliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 31, n. 4, p. 228-234, Jul-Aug 1989.

MATRANGOLO, F. S. V.; LIARTE, D. B.; ANDRADE, L. C.; DE MELO, M. F. *et al.* Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 190, n. 2, p. 63-75, Aug 2013.

MCKEAN, P. G.; VAUGHAN, S.; GULL, K. The extended tubulin superfamily. **Journal of Cell Science**, 114, n. 15, p. 2723-2733, Aug 2001.

MENDES, T. A.; REIS CUNHA, J. L.; DE ALMEIDA LOURDES, R.; RODRIGUES LUIZ, G. F. *et al.* Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, n. 10, p. e2524, 2013.

MENEZES-SOUZA, D.; DE OLIVEIRA MENDES, T. A.; DE ARAUJO LEAO, A. C.; DE SOUZA GOMES, M. *et al.* Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from *Leishmania braziliensis*: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. **Appl Microbiol Biotechnol**, 99, n. 3, p. 1323-1336, Feb 2015.

MENEZES-SOUZA, D.; MENDES, T. A.; GOMES MDE, S.; BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin L-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, n. 1, p. e3426, Jan 2015.

MENEZES-SOUZA, D.; MENDES, T. A. D.; GOMES, M. D.; BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 9, n. 1, Jan 2015.

MENEZES-SOUZA, D.; MENDES, T. A. D.; GOMES, M. D.; REIS-CUNHA, J. L. *et al.* Epitope Mapping of the HSP83.1 Protein of *Leishmania braziliensis* Discloses Novel Targets for Immunodiagnosis of Tegumentary and Visceral Clinical Forms of Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, 21, n. 7, p. 949-959, Jul 2014.

MENEZES-SOUZA, D.; MENDES, T. A. D.; NAGEM, R. A. P.; SANTOS, T. T. D. *et al.* Mapping B-Cell Epitopes for the Peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Its Potential for the Clinical Diagnosis of Tegumentary and Visceral Leishmaniasis. **Plos One**, 9, n. 6, Jun 12 2014.

MOORE, L. L.; SANTRICH, C.; LEBOWITZ, J. H. Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 80, n. 2, p. 125-135, Oct 1 1996.

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F. *et al.* Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, 114, n. 22, p. 11305-11347, Nov 26 2014.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; GOMES, E. M.; PARAGUAI-DE-SOUZA, E.; PALATNIK, M. *et al.* *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 89, n. 4, p. 390-393, Jul-Aug 1995.

PATERAKI, E.; PORTOCALA, R.; LABROUSSE, H.; GUESDON, J. L. Anti-Actin and Antitubulin Antibodies in Canine Visceral Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, 42, n. 2, p. 496-500, 1983.

PEDRAL-SAMPAIO, G.; ALVES, J. S.; SCHRIEFER, A.; MAGALHAES, A. *et al.* Detection of IgG Anti-*Leishmania* Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. **Plos One**, 11, n. 9, Sep 13 2016.

PEREIRA, V. R. A.; REIS, L. D.; SOUZA, M. D.; DE OLIVEIRA, A. P. *et al.* Evaluation of anti-living and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 74, n. 3, p. 292-298, Nov 2012.

PORTMAN, N.; GULL, K. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. **International Journal for Parasitology**, 40, n. 2, p. 135-148, Feb 2010.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, 7, n. 9, p. 581-596, Sep 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2, May 2012.

RIDLEY, D. S.; RIDLEY, M. J. The Evolution of the Lesion in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Pathology**, 141, n. 1, p. 83-96, 1983.

ROCHA, R. D. R.; GONTIJO, C. M. F.; ELOI-SANTOS, S. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. *et al.* Clinical value of anti-live Leishmania (Viannia) braziliensis immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, 11, n. 2, p. 156-166, Feb 2006.

ROSS, R. Further Notes on Leishman's Bodies. **Br Med J**, 2, n. 2239, p. 1401, Nov 28 1903a.

ROSS, R. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. **Br Med J**, 2, n. 2237, p. 1261-1262, Nov 14 1903b.

SAHASRABUDDHE, A. A.; BAJPAI, V. K.; GUPTA, C. M. A novel form of actin in Leishmania: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 134, n. 1, p. 105-114, Mar 2004.

SANTRICH, C.; MOORE, L.; SHERWIN, T.; BASTIN, P. *et al.* A motility function for the paraflagellar rod of Leishmania parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 90, n. 1, p. 95-109, Dec 1 1997.

SARAVIA, N. G.; VALDERRAMA, L.; LABRADA, M.; HOLGUIN, A. F. *et al.* The relationship of Leishmania braziliensis subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **J Infect Dis**, 159, n. 4, p. 725-735, Apr 1989.

SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. *et al.* Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different Leishmania Species. **J Clin Microbiol**, 55, n. 2, p. 495-503, Feb 2017.

SATO, C. M.; SANCHEZ, M. C. A.; CELESTE, B. J.; DUTHIE, M. S. *et al.* Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different Leishmania Species. **Journal of Clinical Microbiology**, 55, n. 2, p. 495-503, Feb 2017.

SAÚDE, M. d. **Leishmaniose Tegumentar.**
<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/Leish-2017-novo-layout.pdf>, p. Casos de Leishmaniose Tegumentar por UF - Brasil/2017, 2019 2017. Acesso em: 03-07-2019.

SCHALLIG, H. D.; SCHOONE, G. J.; BEIJER, E. G.; KROON, C. C. *et al.* Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies in dogs. **Vet Parasitol**, 109, n. 1-2, p. 1-8, Oct 16 2002.

SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A. V.; SARTORI, A. *et al.* Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 96, n. 7, p. 987-996, Oct 2001.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, 18, n. 6, Jun 2017.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, 74, n. 1, p. 25-31, Jan 5 2000.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99, n. 3, p. 239-251, May 2004.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2018.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J Med Res**, 123, n. 3, p. 311-330, Mar 2006.

SKEIKY, Y. A. W.; GUDERIAN, J. A.; BENSON, D. R.; BACELAR, O. *et al.* A Recombinant *Leishmania* Antigen That Stimulates Human Peripheral-Blood Mononuclear-Cells to Express a Th1-Type Cytokine Profile and to Produce Interleukin-12. **Journal of Experimental Medicine**, 181, n. 4, p. 1527-1537, Apr 1 1995.

SKRABA, C. M.; DE MELLO, T. F. P.; PEDROSO, R. B.; FERREIRA, E. C. *et al.* Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, 48, n. 4, p. 437-444, Jul-Aug 2015.

SKRABA, C. M.; PEDROSO, R. B.; FIORINI, A.; ROSADO, F. R. *et al.* Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 78, n. 4, p. 411-417, Apr 2014.

SOUZA, A. P.; SOTO, M.; COSTA, J. M. L.; BOAVENTURA, V. S. *et al.* Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. **Plos One**, 8, n. 6, Jun 12 2013.

SRIVASTAVA, P. D., A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, n. 105, p. 1-6, 2011 2010.

STEBUT, E. V. Leishmaniasis. **Dtsch Dermatol Ges**, p. 191-201, 2014.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 9, n. 5, p. 951-958, Sep 2002.

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

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, 3, n. 5, p. 657-667, Sep 2003.

TESH, R. B. Control of Zoonotic Visceral Leishmaniasis - Is It Time to Change Strategies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 52, n. 3, p. 287-292, Mar 1995.

TUON, F. F.; AMATO, V. S.; GRAF, M. E.; SIQUEIRA, A. M. *et al.* Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. **International Journal of Dermatology**, 47, n. 2, p. 109-124, Feb 2008.

VERAS, P. S. T.; DE MENEZES, J. P. B. Using Proteomics to Understand How Leishmania Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, 17, n. 8, Aug 2016.

VEXENAT ADE, C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 38, n. 3, p. 177-185, May-Jun 1996.

WALKER, J.; ACESTOR, N.; GONGORA, R.; QUADRONI, M. *et al.* Comparative protein profiling identifies elongation factor-1 beta and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 145, n. 2, p. 254-264, Feb 2006.

WEIGLE, K.; SARAIVA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, 14, n. 5, p. 433-450, Sep-Oct 1996.

WEIGLE, K. A.; DEDAVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R. *et al.* Diagnosis of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in Colombia - a Comparison of 7 Methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 36, n. 3, p. 489-496, May 1987.

WEIGLE, K. A.; LABRADA, L. A.; LOZANO, C.; SANTRICH, C. *et al.* PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia). **Journal of Clinical Microbiology**, 40, n. 2, p. 601-606, Feb 2002.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. ORGANIZATION, W. H. Geneva 2010.

WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec** 90, p. 44, 2015.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **World Health Organization - Weekly Epidemiological Record** 22, n. 91, p. 296, 06/2016 2016.

ANEXOS

Anexo 1: Pedido de patente junto à Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica da Universidade Federal de Minas Gerais

“PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, KIT E MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E USOS”

- [1] A presente tecnologia trata de uma proteína quimera recombinante, definida pela SEQ ID N° 1, altamente específica e reativa com soros de pacientes humanos portadores de Leishmaniose Tegumentar (LT), manifestação clínica cutânea ou mucosa. A proteína quimérica é baseada no desenvolvimento de um gene contendo a fusão de sequências codificadoras de epítomos lineares de linfócitos B de proteínas do parasito *Leishmania braziliensis* expressas no estágio amastigota. Além do mais, a tecnologia também compreende um kit contendo a quimera e um método para diagnóstico da leishmaniose tegumentar.
- [2] As leishmanioses são enfermidades causada por parasitos do gênero *Leishmania* e apresentam ampla distribuição nas Américas, contando com a participação de hospedeiros silvestres e domésticos susceptíveis a infecção, incluindo o homem. Esses parasitos possuem um ciclo de vida heteroxeno, apresentando formas promastigotas e paramastigotas que se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, bem como formas amastigotas, que permanecem e multiplicam-se por divisão binária em células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado.
- [3] O ciclo biológico ocorre no hospedeiro vertebrado a partir da picada da fêmea do flebotomíneo infectada, no momento do repasto sanguíneo. No Brasil, esses insetos são popularmente conhecidos por mosquito palha e birigui. As principais espécies envolvidas na transmissão da

doença são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e, *Lu. Migonei*.

- [4] A LT pode manifestar-se na forma cutânea e mucosa, e o aparecimento de sintomas está associado à resposta do hospedeiro. Neste sentido, a doença pode apresentar amplo espectro de manifestações, variando de lesões cutâneas simples, as quais podem curar espontaneamente, até lesões de mucosas, uma forma invasiva hiperalérgica e destrutiva da leishmaniose.
- [5] A leishmaniose cutânea é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no local de picada hospedeiro invertebrado e inoculação das promastigotas infectantes, resultado da multiplicação da *Leishmania* em fagócitos presentes na pele. A leishmaniose cutânea é a forma clínica mais comum e menos severa da LT e geralmente ocorre em indivíduos que apresentam uma resposta imunológica adequada. Quanto à progressão clínica, o tempo médio decorrido entre a inoculação do parasito por um flebotomíneo e o aparecimento das lesões cutâneas em indivíduos infectados por *L. braziliensis* é de 1,7 meses, variando de 1 a 3 meses. No decurso clássico da doença, estas lesões aparecem na forma de pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo, que em seguida evoluem para ulcerações com bordas elevadas, endurecidas e fundo com tecido de granulação grosseira, configurando a clássica lesão com borda em moldura.
- [6] A forma clínica mucosa da leishmaniose tegumentar caracteriza-se por destruição do tecido mucoso e submucoso de maneira lenta e progressiva, sendo na maioria dos casos associada ao parasito *L. (V.) braziliensis*. Geralmente, as lesões aparecem dentro de um período de seis meses a três anos após o desenvolvimento da lesão inicial cutânea. Esta condição clínica é de difícil tratamento e possui pior prognóstico quanto à possibilidade de cura clínica e parasitológica; os fatores associados à evolução das lesões primárias da doença para a

forma clínica mucosa são: tratamento inadequado, tempo da doença e estado nutricional do indivíduo. A rara presença de formas amastigotas de *Leishmania* nas lesões e a intensa reação de hipersensibilidade tardia observada nos pacientes são também considerados fatores importantes associados à leishmaniose cutânea. Na grande maioria dos casos, a leishmaniose mucosa acomete a mucosa nasal, com importante comprometimento do septo, seguindo-se em ordem de frequência o envolvimento da mucosa oral e as vias aéreas superiores e em todos estes casos existe um considerável risco de deformidades permanentes.

- [7] Após a suspeita clínica, o diagnóstico da LT, forma cutânea é feito por meio de exames laboratoriais. O teste de intradermoreação de Montenegro era um grande aliado da clínica no diagnóstico da leishmaniose tegumentar, porém a produção do antígeno do teste foi descontinuada. Há ainda o diagnóstico parasitológico direto, que pode ser feito a partir da excisão de fragmentos da borda da úlcera, que são fixados em lâmina e corados. A sensibilidade do teste é proporcional ao tempo de evolução, logo, quanto mais recente o teste for feito, maiores as chances de visualização do parasito. Contudo, a escassez parasitária em úlceras causadas por *L. braziliensis* pode ser um fator limitante para o uso desta metodologia, aumentando a chance de resultados falso-negativos. Outro teste direto é a inoculação de amostra de indivíduo suspeito em cobaias, além de cultura e exame histopatológico.
- [8] O diagnóstico da LT forma mucosa também pode ser feito por meio de exames laboratoriais, porém na forma mucosa, o parasito raramente é encontrado em lesões, mesmo utilizando-se mais de uma técnica de exame direto. Os testes sorológicos tais como ELISA e imunofluorescência indireta possuem alta sensibilidade, porém menor especificidade, uma vez que reações cruzadas podem ocorrer em amostras de pacientes portadores de doença de Chagas,

paracoccidioidomicose, pênfigo e leishmaniose visceral. Técnicas moleculares como PCR possuem alta especificidade e sensibilidade, porém demandam de laboratório bem equipado e pessoal treinado. Além disso, sua especificidade pode estar relacionada com a presença de número mínimo de parasitos na amostra.

- [9] Com a descontinuação da fabricação do antígeno para o teste de intradermo-reação de Montenegro, o sistema de saúde ficou sem o recurso em meados 2016 a 2017, quando os últimos kits foram usados e as unidades de saúde ficaram desprovidas do recurso. O diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana ficou então ainda mais complicado, uma vez que o teste, apesar de apresentar sensibilidade variável, era de suma importância no auxílio diagnóstico dos casos suspeitos país afora.
- [10] O documento de patente BR1020180160095, intitulado “Proteína recombinante, método e kit para diagnóstico das leishmanioses visceral e tegumentar no homem e cão”, depositado em 08 de agosto de 2018, trata de uma proteína recombinante, um kit e um método baseado na utilização da proteína para detecção de leishmanioses. A sequência proteica do referido pedido difere daquela contida na presente tecnologia.
- [11] O documento de patente BR1020150161620, intitulado “Proteína recombinante multiepítipo e seu uso para diagnóstico e tratamento de leishmaniose”, depositado em 03/07/2015, trata de uma proteína multiepítipo recombinante, seu processo de obtenção e suas aplicações para detecção de espécies de *Leishmania*. A sequência proteica do referido pedido difere daquela contida na presente tecnologia.
- [12] No estado da técnica não foi encontrada tecnologia contendo a proteína químera recombinante definida no presente pedido para utilização no diagnóstico de leishmaniose.

[13] A presente tecnologia trata de uma proteína quimera recombinante, altamente específica e reativa com soros de pacientes humanos portadores de Leishmaniose Tegumentar (LT), manifestação clínica cutânea ou mucosa. A proteína quimérica é baseada no desenvolvimento de um gene contendo a fusão de sequências codificadoras de epítopos lineares de linfócitos B de proteínas do parasito *Leishmania braziliensis* expressas no estágio amastigota. A quimera contém peptídeos específicos para diagnóstico da LT, garantindo a não ocorrência de reatividade cruzada com proteínas dos microrganismos *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium leprae*, agentes etiológicos da Doença de Chagas, Toxoplasmose e Hanseníase humana, respectivamente. Nesse sentido, a proteína proposta é inédita, e apresenta elevada sensibilidade para diagnosticar os casos de LT, além de elevada especificidade quando testada em paciente com outras doenças comumente encontradas em áreas endêmicas e frequentemente associadas a resultados falsos positivos em testes laboratoriais e/ou diagnóstico clínico. Além do mais, a tecnologia também compreende um kit contendo a quimera e um método para diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[14] A **Figura 1** representa a **(A)** comparação de reatividade pelo teste ELISA em soros de pacientes infectados por *L. brasiliensis* apresentando a forma mucosa(LTH-MC); infectados por *L. brasiliensis* apresentando a forma cutânea(LTH-C); soros de pacientes com Doença de Chagas (DC); soros de pacientes com Toxoplasmose(TX); Soro de pacientes com Hanseníase (HS); além de controle negativo com soros de pacientes não infectados(CT). **(B)** Sensibilidade, especificidade e acurácia da proteína quimérica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

- [15] A presente tecnologia trata de uma proteína quimérica recombinante composta por regiões conservadas de proteínas de *L. brasiliensis*, além de um kit e um método para diagnóstico de leishmaniose tegumentar.
- [16] Mais especificamente, a proteína quimérica recombinante é definida pela SEQ ID N° 1.
- [17] O kit para diagnóstico da leishmaniose tegumentar é caracterizado por compreender:
- a) a proteína quimérica definida pela SEQ ID N°1;
 - b) um anticorpo secundário ou uma proteína, onde o anticorpo secundário (IgG, IgM, IgA, IgE e/ou suas respectivas subclasses), ou a proteína (proteína A e/ou proteína G), são conjugados a uma enzima ou a um marcador;
 - c) um reagente para detectar a enzima ou marcador.
- [18] No item “a”, a proteína pode estar ligada a um suporte sólido, selecionado do grupo de material compreendendo nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e/ou poliestireno; ou a um carreador, preferencialmente partículas de ouro.
- [19] No item “b”, o marcador deve ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.
- [20] No item “c”, a enzima deve ser selecionada do grupo compreendendo peroxidase, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase.
- [21] O método para diagnóstico de leishmaniose tegumentar compreende as seguintes etapas:
- a) exposição de uma amostra à proteína definida pela SEQ ID N°1, ligada a um suporte sólido ou a um carreador;

- b) adição de um anticorpo secundário ou uma proteína, que estejam conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se liguem aos anticorpos da amostra da etapa (a);
 - c) detecção dos anticorpos específicos para *Leishmania braziliensis* na amostra citada na etapa (a), utilizando-se reagentes capazes de detectar a enzima ou o marcador citado na etapa (b).
- [22] Na etapa “a”, a amostra pode ser selecionada do grupo compreendendo sangue, soro, plasma ou outro fluído corporal. O suporte sólido pode compreender materiais consistindo em nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno, poliestireno ou outro utilizado com a mesma finalidade dos demais descritos.
- [23] Na etapa “b”, o anticorpo secundário pode compreender IgG, IgM, IgA, IgE e respectivas subclasses. A proteína relacionada a esta etapa pode ser Proteína A e/ou Proteína G. A enzima descrita nessa etapa pode ser selecionada do grupo consistindo em peroxidase, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase. Além do mais, o marcador pode ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.
- [24] Na etapa “c”, o anticorpo de detecção pode ser selecionado do grupo compreendendo detecção de fluorescência, imunofluorescência, imunoluminescência, absorbância ou de radioisótopos.
- [25] A proteína definida na presente tecnologia pode ser utilizada para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar em humanos.
- [26] A presente tecnologia pode ser mais bem compreendida através dos exemplos que se seguem, não limitantes.

EXEMPLO 1. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

- [27] Os epítomos foram selecionados a partir de 20 proteínas reconhecidas pela técnica de imunoproteômica. Das 20 proteínas, 13

foram reconhecidas no estágio amastigota do parasito, e selecionadas por estarem em maior contato com o sistema imune do hospedeiro. Dessas, 32 epítomos de célula B estavam em região de desordem estrutural, significando linearidade, porém 19 delas mostraram-se similares a *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium leprae* e foram excluídas, restando 13 que mostraram divergência maior que 80%, aumentando a possibilidade de não ocorrer reações cruzadas. O fato de os epítomos selecionados das proteínas possuírem divergência com *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium leprae* objetiva evitar reações cruzadas entre indivíduos portadores de patologias causadas por tais patógenos.

- [28] Os 13 epítomos selecionados para compor a proteína quimérica são sublinhados abaixo. Existe uma metionina inicial, cauda de histidina e stop codon. Sequência de aminoácidos da proteína:

MTNSAKSANEGSGSGEDEEVAEAPPAEAPAEVTAGGSGSGHDFSHQGGGDNA
SKGSGSGLEDQAPSTGSGSGEGESREDLDMPPDPALGSGSGMSPEDATGSGSG
GATKRYTGNKERGSGSGKAGTGPDAEKSGSGSGVTYAGPDGSVSEKSGSGSKD
TYEGEWRNDSATGSGSGAKDAEKKKTGSGSGKMNEPAPPFSGSGSGWKKGDAT
MKPEHHHHHH*

- [29] A sequência do gene codificador da quimera foi otimizada pelo software "Codon Optimization Tool" da IDT para expressão em *E. coli* é a seguinte:

ATGACGAACAGCGCCAAAAGCGCCAACGAGGGCTCGGGAAGCGGCGAAGAC
GAAGAGGTAGCAGAAGCGCCACCTGCCGAGGCAGCCCCAGCAGAAGTAACT
GCAGGTGGCTCCGGTTCGGGTACGATTTCTCCCATCAGGGTGGGGGTGACA
ATGCTTCGAAAGGTTTCGGGTTCGGGTGGAAGACCAAGCGCCCTCAACAGG
TTCTGGCTCCGGCGAAGGTGAGTCCCGCGAGGATCTGGATATGCCGCCAGAC
CCAGCATTGGGTTCGGGAAGCGGAATGTCCCCCGAGGACGCGACAGGTGGC
AGCGGCAGCGGAGCCACAAAACGCTACACTGGAAATAAAGAGCGTGGCTCG
GGCAGTGGCAAAGCCGGTACTGGACCAGACGCTGAGAAGTCTGGTTCTGGTA
GTGGCGTTACGTATGCTGGTCCCGACGGCAGTGTGAGTAAAAAGGGTCAGG
GAGCGGCAAGGACACTTATGAAGGAGAATGGCGTAATGATTCGGCGACAGGT
AGTGGATCTGGGGCTAAGGATGCTGAAAAAAGAAAACGGGAAGCGGTTCTG
GCAAAATGAATGAACCCGCCCCACCATTGTTGGTAGTGGCTCGGGATGGAAGAA
GGGTGACGCGACGATGAAGCCCGAACATCATCACCACCACCACTAA

- [30] O potencial dos peptídeos de atuarem como epítomos é mantido na quimera (Score de 1.74). Em adição, a proteína tem alta desordem estrutural, predita pelo programa IUPRED (Score de 0,91; 0,74 e 0,77), significando que os peptídeos estarão disponíveis para ligação com anticorpos, não possuindo conformação.
- [31] A sequência do gene codificador da proteína quimérica foi desenhada utilizando o software Gene Oligo Explorer (versão 1.5, 2010). Em seguida, o gene foi sintetizado por empresa de biotecnologia especializada.
- [32] O plasmídeo contendo 4µg do gene quimérico liofilizado foi armazenado a -20°C até o momento do uso. Para o uso, o plasmídeo foi primeiramente centrifugado a 6000 G por 5 minutos, a fim de evitar perda de plasmídeo que porventura estivesse aderido à tampa. Em seguida, o plasmídeo foi ressuspendido utilizando-se 50µL de água ultrapura aquecida a 50°C e homogeneizado em vórtex por 1 minuto. Posteriormente, o microtubo contendo o plasmídeo ressuspendido foi centrifugado a 6000 G por mais um minuto.
- [33] Na etapa de transformação, 1µL do plasmídeo quimérico foi adicionado a 50µL de células competentes Arctic Express (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) previamente armazenadas a -80°C. Em seguida as amostras foram transferidas para cubetas de eletroporação MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, EUA) de 0,1cm, e submetidas a um pulso de 2,50kV no equipamento de eletroporação MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, EUA). Após a eletroporação, foram adicionados 200µL do meio de cultura 2xYT líquido, seguido por incubação durante uma hora a 37°C sob agitação em shaker a 200rpm. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar 1,5% contendo 50µg/mL de Kanamicina (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA) e 20µg/mL de Gentamicina (Neoquímica,

Anápolis, Brasil) e distribuídas uniformemente pela placa utilizando uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas overnight a 37°C.

[34] Após crescimento, 5 colônias foram submetidas à reação de PCR, a fim de verificar-se a presença do plasmídeo no vetor de expressão, utilizando-se 50µL de Master Mix (Promega), 10µL de primer T7 forward e reverse a 2 milimolar e 40µL de água ultra-pura. O termociclador (T-100 Biorad®) foi programado em temperatura inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a temperatura de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento a 60°C por 30 segundos e temperatura de extensão a 68°C por 2 minutos, e ainda extensão final a 68°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a separação em gel de agarose 1% a 100-120 volts em tampão TAE 1X, contendo 0,3µg/µL de brometo de etídio (Bio-Rad, Hercules, EUA). Para indução da expressão da proteína quimérica, a colônia de bactérias isoladas no sistema de clonagem foi inoculada em dois Erlenmeyers de 100 mL cada contendo 50mL de meio de cultura 2xYT (Tryptona/Peptona + Extrato de Levedura + NaCl + Kanamicina 50µg/mL e Gentamicina 20µg/mL) e incubadas overnight a 37 °C sob agitação a 200RPM em estufa. Em seguida, as 25mL das culturas foram inoculadas em cada um dos quatro Erlemeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio 2xYT e cultivadas até a densidade ótica (DO) de 0,6-0,8 a 37°C, sob agitação, a 200 RPM, por três horas.

[35] Após atingir a DO desejada, a expressão foi induzida com a adição de 0,1mM de Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo (IPTG) (Invitrogen®, São Paulo, Brasil) por 24 horas a 12°C sob agitação a 200RPM. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 7000 RPM, por 40 minutos a 4°C, na centrífuga “5804R” (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante desprezado. Em seguida, os pellets foram armazenados a -80°C. Alíquotas de 1 mL da cultura imediatamente antes da adição de IPTG, e após o período de indução da expressão, foram também coletados em microtubos e centrifugadas

por 5 minutos a 8.000 RPM e armazenado a -20°C, para serem utilizadas como controle de expressão.

[36] O pellet contendo a cultura após a etapa de expressão foi ressuspendido em 100mL de PBS (Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4 + NaCl , pH 7,4) contendo 30mM de Imidazol e lisozima 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) e incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, o extrato foi lisado em sonicador (DES 500 – UNIQUE®) após 10 ciclos de 1 minuto de sonicação em gelo, cada ciclo com intervalo de 30 segundos e potência 40% a amostra foi centrifugada por 5000RPM por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante coletado (fração solúvel) foi filtrado em coluna de cromatografia (His Trap HP) contendo 5mL de resina para purificação de proteína. A coluna contendo resina previamente regenerada foi lavada utilizando três vezes o seu volume com o tampão A (PBS contendo imidazol 30mM). Na última lavagem, foi deixada sob agitação com tampão A por 15 minutos. Em seguida, a amostra contendo a fração solúvel foi aplicada duas vezes na coluna. As frações de flowthrough foram coletadas. Após a passagem de toda a amostra, a eluição foi realizada através da adição do tampão B (PBS contendo imidazol 500mM) e a coluna foi mantida a 8°C overnight. Em seguida, as frações eluídas contendo a proteína recombinante foram coletadas em eppendorfs e armazenadas a 8°C.

[37] As frações obtidas em tempo 0 (pré-indução), tempo 24 pós indução e proteína após purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12.5%. As amostras obtidas nos ensaios de expressão e purificação foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-acrilamida 40%. O gel de separação 12,5% foi preparado utilizando tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8, SDS 0,01%, persulfato de amônio 0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6,8. Às amostras obtidas da indução e teste de solubilidade foram adicionadas

25 µL de tampão de amostra 4X (SDS 10%, Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, azul de Bromofenol 1%, 2-β-mercaptoetanol 5% e glicerol 10%) e 75µL de água de MilliQ. As amostras foram então pré-aquecidas a 100oC durante 10 minutos para desnaturação das proteínas e posteriormente aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada em aparelho Mini Protean II Biorad®, utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1% e pH 8,3) sob voltagem constante de 100 volts. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 30 minutos com a solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) a temperatura ambiente e em seguida descorados overnight em solução etanol 30% e ácido acético 10% a temperatura ambiente.

- [38] As amostras de proteína quimérica purificadas foram 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 e a leitura realizada em aparelho Versamax (Molecular Devices®, Sunnyvale, EUA) com comprimento de onda de 562nm.

EXEMPLO 2. ANÁLISES SOROLÓGICAS UTILIZANDO A PROTEÍNA QUIMÉRICA

- [39] **Amostras de soros.** As seguintes amostras de soro foram utilizadas para a realização dos ensaios de ELISA para o sorodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana: soros de pacientes infectados pelo parasito *Leishmania braziliensis*, apresentando a patologia na forma mucosa (n=35), soros de pacientes infectados pelo parasito *Leishmania braziliensis*, apresentando patologia na forma cutânea (n=35). Para averiguar presença de reações cruzadas, foram testados soros de pacientes não-infectados (controle negativo, n=35) soros de pacientes com Doença de Chagas (n=35),

soros de pacientes com Toxoplasmose (n=57) soros de pacientes com Hanseníase (n=12).

- [40] **Teste ELISA.** Para a padronização do teste, foram utilizadas placas de ELISA 96 poços (Nalge Nunc Intl®, Penfield, EUA), diferentes concentrações da proteína quimérica (0,01; 0,1; 1,0 e 10µg), diluições de soros (pool de amostras de soros de pacientes com Leishmaniose tegumentar cutânea, leishmaniose tegumentar mucosa, pacientes controle negativo, toxoplasmose, hanseníase e doença de Chagas) também foram testados em diferentes concentrações (1:50; 1:100; 1:250 e 1:500) e de conjugado anti-IgG marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) (1:500; 1:1000; 1:10.000 e 1:5000).
- [41] Para a sensibilização da placa, 100uL/poço da proteína recombinante diluída em coating buffer (Na₂CO₃ 0,16%, NaHCO₃ 0,24% e pH 9,6) foram pipetados. Após incubação por 12-16 horas a 8°C, a placa foi lavada 5 vezes com solução de lavagem (PBS + tween 0,05%) e bloqueada com 200 µL/poço de PBS acrescido de 1,0% de BSA (Sigma-Aldrich®) durante uma hora a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada 5 vezes com solução de lavagem, 100 µL do pool de soros positivos e negativos diluídos em PBS com 1% de BSA foram adicionados e incubados a 37°C por uma hora. Decorrido o tempo, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem e 100µL do anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase e diluído em PBS-tween BSA 1% foram adicionados e incubados a 37°C por uma hora. Após lavagem da placa por cinco vezes com a solução de lavagem adicionou-se 100 µL da solução reveladora (Ácido cítrico 0,1M, Na₂PO₄ 0,2 M, TMB 0,05% e H₂O₂ 0,1%). Em seguida a placa foi incubada a 37°C ao abrigo de luz por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50µL de H₂SO₄ 2M e a absorbância foi obtida em leitor de ELISA a 450nm no leitor de ELISA Versamax (Molecular Devices®, Sunnyvale, EUA).

- [42] Os resultados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism. Os testes de reação cruzada com diferentes patógenos (*Toxoplasma gondii*, *Trypanonoma cruzi*, *Mycobacterium leprae*) mostrou boa separação, mostrando o potencial da quimera em evitar reações cruzadas com doenças que possam ter clínica semelhante e dificultar o diagnóstico diferencial. A proteína quimérica apresentou sensibilidade, especificidade e acurácia de 100,00% (**Figura 1**).

REIVINDICAÇÕES

- 1. PROTEÍNA QUIMÉRIA RECOMBINANTE, caracterizada por ser** definida pela SEQ ID N°1.
- 2. KIT PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHANIOSE TEGUMENTAR, caracterizado por** compreender:
 - a) a proteína quimérica definida pela SEQ ID N°1;
 - b) um anticorpo secundário ou uma proteína, onde o anticorpo secundário (IgG, IgM, IgA, IgE e/ou suas respectivas subclasses), ou a proteína (proteína A e/ou proteína G), são conjugados a uma enzima ou a um marcador;
 - c) um reagente para detectar a enzima ou marcador.
- 3. KIT PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHANIOSE TEGUMENTAR, de acordo com a reivindicação 2, etapa "a" caracterizado pela** proteína estar ligada a um suporte sólido selecionado do grupo de material compreendendo nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e/ou poliestireno; ou a um carreador, preferencialmente partículas de ouro.
- 4. KIT PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHANIOSE TEGUMENTAR, de acordo com a reivindicação 2, etapa "b" caracterizado pelo** marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.
- 5. KIT PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHANIOSE TEGUMENTAR, de acordo com a reivindicação 2, etapa "c" caracterizado pela** enzima ser selecionada do grupo compreendendo peroxidase, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase.
- 6. MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- a) exposição de uma amostra à proteína definida pela SEQ ID N°1, ligada a um suporte sólido ou a um carreador;
- b) adição de um anticorpo secundário ou uma proteína, que estejam conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se liguem aos anticorpos da amostra da etapa (a);
- c) detecção dos anticorpos específicos para *Leishmania braziliensis* na amostra citada na etapa (a), utilizando-se reagentes capazes de detectar a enzima ou o marcador citado na etapa (b).

7. MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, de acordo com a reivindicação 6, etapa “a”, caracterizado pela amostra ser selecionada do grupo compreendendo sangue, soro, plasma ou outro fluído corporal; e o suporte sólido compreender materiais consistindo em nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno, poliestireno ou outro utilizado com a mesma finalidade dos demais descritos.

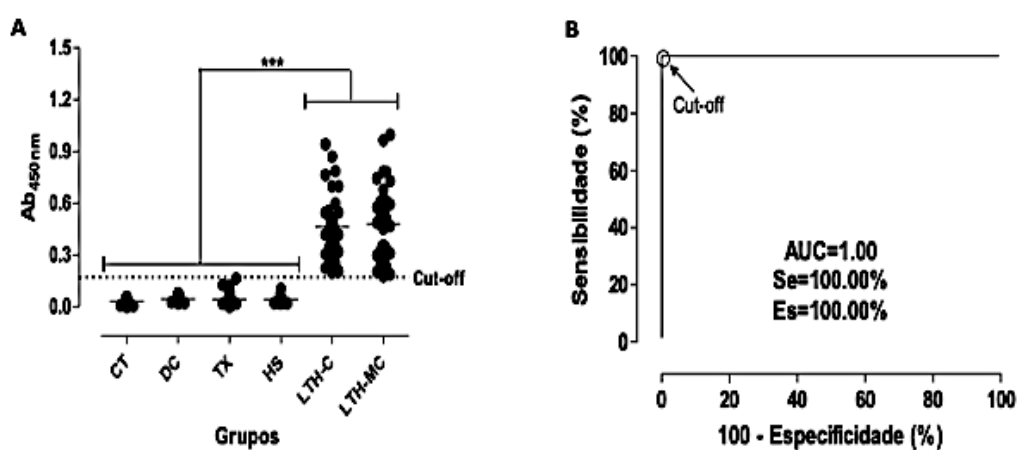
8. MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, de acordo com a reivindicação 6, etapa “b”, caracterizado pelo anticorpo secundário compreender IgG, IgM, IgA, IgE e respectivas subclasses e a proteína ser Proteína A e/ou Proteína G; a enzima descrita nessa etapa ser selecionada do grupo consistindo em peroxidase, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase; e o marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

9. MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, de acordo com a reivindicação 6, etapa “c”, caracterizado pelo anticorpo de detecção pode ser selecionado do grupo compreendendo detecção de fluorescência,

imunofluorescência, imunoluminescência, absorvância ou de radioisótopos.

10. **USO** da proteína definida na reivindicação 1, caracterizado por ser para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Humana.

DESENHOS Figura 1

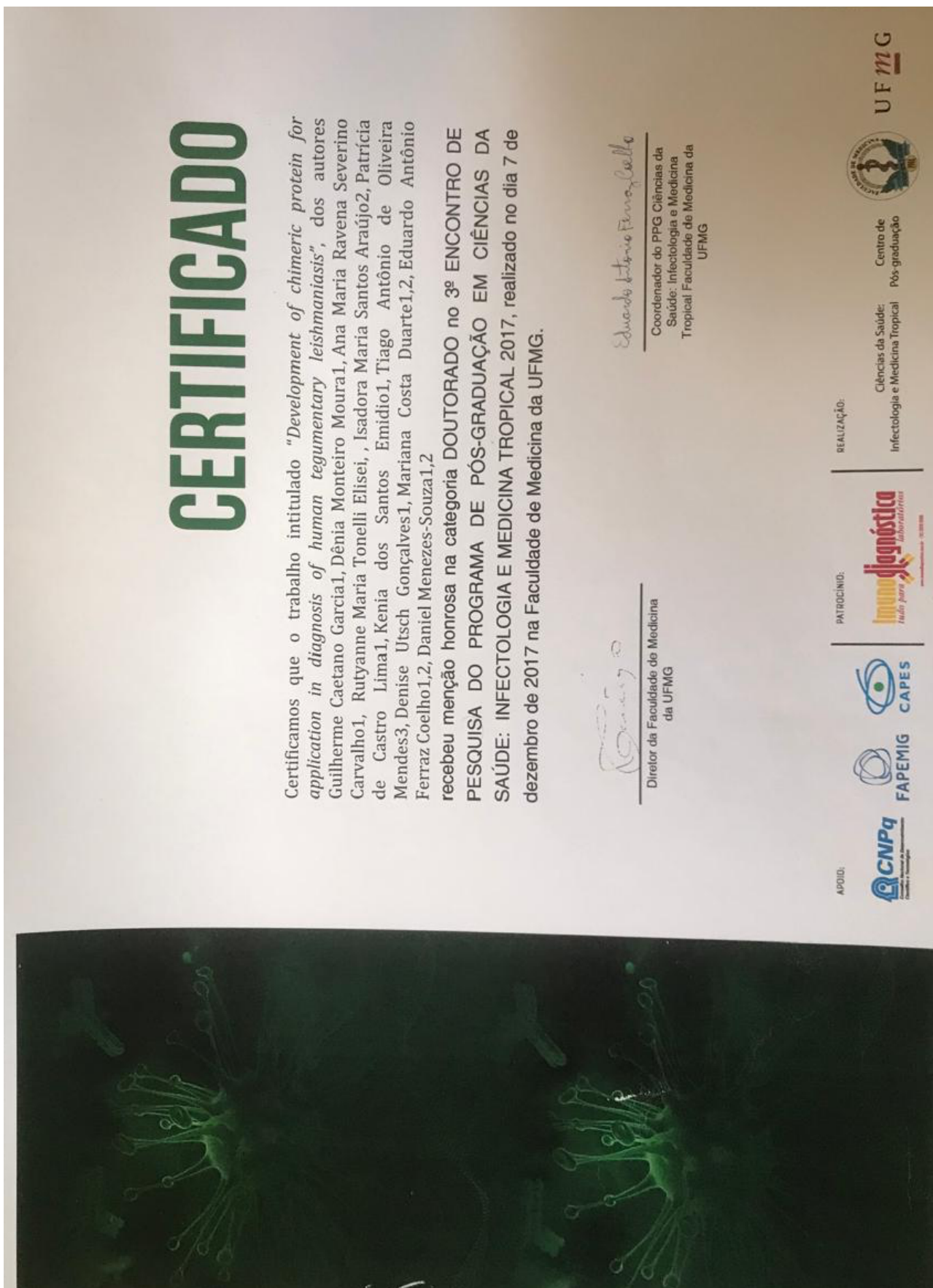


RESUMO

“PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, KIT E MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E USOS”

A presente tecnologia trata de uma proteína quimera recombinante, definida pela SEQ ID N° 1, altamente específica e reativa com soros de pacientes humanos portadores de Leishmaniose Tegumentar (LT), manifestação clínica cutânea ou mucosa. A proteína quimérica é baseada no desenvolvimento de um gene contendo a fusão de sequências codificadoras de epítopos lineares de linfócitos B de proteínas do parasito *Leishmania braziliensis* expressas no estágio amastigota. Além do mais, a tecnologia também compreende um kit contendo a quimera e um método para diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

Anexo 2: Certificados e premiações obtidos durante a realização do trabalho





CERTIFICATE

The Organizing Committee of The International Workshop of The Post-Graduation Program in health Sciences: Infections Diseases and Tropical Medicine awards Guilherme Caetano Garcia for the 1st place on Rapid Fire Presentation.

Belo Horizonte, November 21st

2018

Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Coordinators of the Post-Graduate Program in Infectious Diseases and Tropical Medicine Faculty of Medicine
Federal University of Minas Gerais

Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

SUPPORT



SPONSOR



ACHIEVEMENT





Sociedade
Brasileira para o
Progresso da
Ciência

73ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC

• 18 a 24 de julho de 2021 •

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **DESENVOLVIMENTO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA COMPOSTA POR MÚLTIPLOS EPÍTOPOS DE LINFÓCITOS B PARA SER EMPREGADA COMO ANTÍGENO EM TESTES SOROLÓGICOS PARA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA**, de autoria de *Yuri Márcio Campos Barbosa, Guilherme Caetano Garcia, Ana Maria Ravena Severino Carvalho, Mariana Costa Duarte, Matheus Fernandes Costa e Silva, Fernanda Alvarenga Cardoso Medeiros, Eduardo Antônio Ferraz Coelho, Dênia Monteiro de Moura Franco, Denise Utsch Gonçalves, Tiago Antônio de Oliveira Mendes e Daniel Menezes-Souza*, apresentado na área de Medicina da Sessão de Pôsteres da 73ª Reunião Anual da SBPC, realizada de 18 a 24 de julho de 2021, recebeu menção honrosa em reconhecimento ao mérito do trabalho e ao conjunto de dados apresentados.

Emissão: Agosto de 2021.

Certificado nº AH73RA10102 - Este número permite a verificação da autenticidade do documento em:
<https://reunioes.sbpcnet.org.br/certificados/>



Ildeu de Castro Moreira
Ildeu de Castro Moreira
Presidente da SBPC
Coordenador da 73ª Reunião Anual

Paulo Roberto Hofmann
Paulo Roberto Hofmann
Secretário-Geral da SBPC
Coordenador da 73ª Reunião Anual