



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA**



**VALIDAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS RECOMBINANTES
COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA E VACINAL PARA
LEISHMANIOSE HUMANA**

ANA CAROLINA SOARES DIAS

**São Luís – MA
JUNHO/2016**

ANA CAROLINA SOARES DIAS

**VALIDAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS RECOMBINANTES
COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA E VACINAL PARA
LEISHMANIOSE HUMANA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

**São Luís – MA
JUNHO/2016**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

SOARES DIAS, ANA CAROLINA.

VALIDAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS RECOMBINANTES COMO
FERRAMENTA DIAGNÓSTICA E VACINAL PARA LEISHMANIOSE HUMANA
/ ANA CAROLINA SOARES DIAS. - 2016.

110 p.

Coorientador(a): LUIZ RICARDO GOULART.

Orientador(a): SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS,
2016.

1. Diagnóstico. 2. Leishmaniose. 3. Peptídeos
miméticos. 4. Vacina. I. FERREIRA PEREIRA, SILMA REGINA.
II. GOULART, LUIZ RICARDO. III. Título.

ANA CAROLINA SOARES DIAS

**VALIDAÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS
RECOMBINANTES COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA E
VACINAL PARA LEISHMANIOSE HUMANA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Banca examinadora

Presidente da banca

Examinador 1 – externo

Examinador 2 – interno

Examinador 3 – interno

Examinador 4 – interno

**São Luís – MA
JUNHO/2016**

Dedico à minha família por ter sido a minha paz durante esses anos tão difíceis.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é a concretização de um sonho que um dia não parecia estar ao meu alcance e consegui porque me apoiei em ombro de gigantes e por isso eu agradeço:

A Deus pelo dom da vida, por ser a raiz da minha força;

Aos amores da minha vida - meus pais: Domingos Soares e Raimunda Dias, que durante anos estivemos distantes apenas por alguns quilômetros, mas nunca deixaram de me apoiar. Mãe, sol que ilumina minha vida, obrigada pelas orações, incentivo de todos os dias, pelo seu amor incondicional e por cultivar sempre a minha fé. Pai, meu herói! Obrigada por todos os valores repassados e pelo exemplo de honestidade, perseverança e determinação. Vocês sabem o tamanho da saudade que sinto, foi muito difícil dormir e acordar e não tê-los por perto, mas tudo era minimizado porque sei que tenho vocês do meu lado. Assim como eu disse que o diploma de graduação era nosso, que a dissertação era nossa, digo a vocês que esta tese também é nossa.

Aos meus amados irmãos Augusto César e Alexandre Celso, que mesmo distante, sei que posso contar com vocês. A essência que nos une é maior que uma simples ligação fraterna, chama-se amor. É isso que confere todo esse carinho, amizade e doação. Adoro tê-los como irmãos.

À minha vovó Catarina, minha rainha guerreira, a vida não seria a mesma sem seu sorriso e sem seu carinho. Agradeço a Deus tê-la presente em minha vida. Obrigada por sempre me receber em largos e longos abraços e pelas orações. Te amo!

Ao meu vovô Antônio (*in memoriam*), quanta saudade meu velho! Você que sempre me deu forças e exemplo de quando se quer, se consegue!

Aos demais familiares, obrigada pela torcida para que tudo desse certo!

Aos meus padrinhos Teresa Fontinelle e Jesus Fontinelle por ter acreditado em mim!

A minha orientadora Silma Regina Pereira, muito obrigada! Agradeço por aceitar a orientar a menina do Piauí, por todas as oportunidades. Levarei seus ensinamentos ao

longo da minha vida profissional e pelo grande presente de conhecer e trabalhar com o prof. Luiz Ricardo Goulart, meu coorientador.

Ao meu coorientador, prof. Luiz Ricardo Goulart, muito obrigada! Você é meu pai científico. O seu incentivo e sua confiança foram primordiais para a conclusão desse trabalho. Você me ensinou não só pesquisar, mas os segredos do sucesso: humildade e ânimo. Digo e repito: O mundo deveria ter mais prof. Luiz Ricardo Goulart.

À Juliana Franco, muito obrigada pela dedicação em ensinar técnicas, na discussão de resultados, pela paciência em repetir várias vezes o que eu não entendia! Sucesso para você!

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular, em especial:

- Santana Viegas, minha mãezinha de São Luís-Maranhão, você realmente fez papel de mãe, obrigada pelos conselhos, apoio incondicional, dias e dias me ajudando a pensar e executar procedimentos antes nunca vistos. Minha mãe do coração, te amo!

- Marta Regina Belfort, muito obrigada! Lutas, agonias e alegrias resumem os anos de convivência. Martinha, você é uma amiga eterna que mora no meu coração. Muito obrigada nas coletas das amostras, obrigada por me ouvir, enfim... Muito obrigada!

- Vanessa Moreira e sua família, obrigada por tudo!

- Mayara Ingrid Lima, muito obrigada pela recepção em Uberlândia-MG, pela convivência, pelas discussões de técnicas, experimentos! Muito obrigada!

- Perla Lopes, a sra. Nadal. Guerreira, muito obrigada pela torcida e pelas preocupações! Te admiro muito!

- Jaqueline Pinho, a menina meio maranhense e paraense. Obrigada por ouvir os “causos”, aflições da vida e pelas histórias divertidas.

- Luis Cláudio Lima, um prazer ter convivido com você! Sucesso meu amigo, você merece demais!

- Augusto Júnior, obrigada pelas caronas, sem elas a vida seria bastante complicada!
Lembre-se: Lutar sempre, vencer talvez, desistir nunca! Sucesso, você vai longe!

- Juliana Melo – linda Ju! Você é um doce de menina! Seu carinho enorme sempre fortalece! Sucesso Ju, você merece!

- Solange Frazão, muito obrigada pela torcida e por compartilhar alguns “desesperos”.
Sucesso para você!

- Lays Alacoque, muito obrigada pelas conversas revigorantes! Sucesso e paz para você!

- Vera Maciel, obrigada pela torcida de sempre e pelas histórias divertidas!

- Leonardo Feitosa, muito obrigada pela contribuição no inglês.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial:

- Mayara Ingrid Lima, Aline Gomes - minha “Best”; Patrícia Terra - padrão ouro; Jéssica Reginna “7Sons Best”, Victor Alexandre, Patrícia Tiemi, Carlos Trindade, Emília Rezende, Mariana Zoia, Lara Vecci, Larissa Maia, Cláudia Rodrigues, Bruna França, Hebreia Oliveira e sua Valentina, Tâmara Morais, Valéria, Galber Araújo, Paula Santos, Luciana Bastos, Lorraine Cristina, Letícia Dantas, Isabella Cristina, Fabiana Santos, Léa Duarte, Roberta Rosa, Ulisses Pereira: nunca esquecerei de vocês. Muito obrigada, vocês me ajudaram de forma imensurável.

Ao Laboratório de Tripanossomatídeos:

Prof. Dr. Cláudio Vieira pela acolhida, discussão de resultados e pela disponibilidade;

- Amanda Quintal por me apresentar o mundo: “*Leishmania*”, aprendi muito com você.
Muito obrigada!

- João Paulo, “meu irmão” muito obrigada pela parceria!

Bruna Borges, Adele Rodrigues, Aline Alves, Ana Flávia Notário, Thaise Lara, Samuel Cota, Paula Brígido, Flávia Martins, Marlus Santos, Rosiane Alves, muito obrigada! A ajuda de vocês foi de grande valia!

À Dra. Conceição Pedrozo, Lucimar e equipe de enfermagem do Hospital Presidente Vargas muito obrigada pelas coletas e acolhida dos pacientes. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

À profa. Dra. Arlene Caldas pela disponibilidade em ceder amostras para a realização do trabalho.

A todos pacientes voluntários, muito obrigada pela imensa contribuição!

Às amigas de curso e da vida: Mariana Arruda e Rosiane Penha que rimos, sofremos e muitas vezes choramos juntas. Vocês moram no meu coração e vamos conseguir, sim!

Às secretarias do curso Cleidiane Serra e Dayane Serra muito obrigada pela paciência, preocupação e pelas ouvirem os “aperreios” durante o curso.

À professora Patrícia Albuquerque pela paciência, disposição em sempre resolver os problemas e querer o melhor de cada aluno do curso. Muito obrigada!

Ao professor Williams Filho, meu eterno orientador! Com você aprendi os primeiros passos de como se fazer pesquisa, sua orientação na iniciação científica foi importante para hoje eu estar aqui, escrevendo minha tese. Muito obrigada por sempre acreditar no meu trabalho!

Aos meus amigos que sempre acompanharam de perto esta caminhada, em especial: Ana Luísa Silva, Clidia Pinto, Fabiana França, Juciane Vaz, Lianna Ramalho, Liviane Martins, Lucas Pinheiro, Maiara Gois, Miriam Castelo, Mirna Gois, Monique Xavier, Natália Andrade, Nayra Anjos, Tatiana Barreto, Tatiana Pacheco, Teresinha Aguiar. Muito Obrigada pela torcida e pelo apoio! Vocês moram no meu coração!

Ao CNPQ e FAPEMA pelo financiamento do projeto.

À FUNAPE e a CAPES pelas bolsas concedidas durante o curso.

À UFMA, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia.

A humildade exprime, uma das raras
certezas de que estou certo:
a de que ninguém é superior a ninguém
(Paulo Freire)

RESUMO

Leishmaniose é uma doença negligenciada e endêmica no Brasil, especialmente na região Nordeste, sendo causada por cerca de 20 espécies do protozoário *Leishmania*. O diagnóstico abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Apesar de existir várias técnicas diagnósticas que podem ser utilizadas, nenhum dos testes disponíveis apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. Baseado nisto, este trabalho se propôs a validar três peptídeos recombinantes miméticos (LC1, LC2 e LT) obtidos por *Phage display*, para o desenvolvimento de um diagnóstico imunológico rápido, específico, sensível e de baixo custo. Foram utilizados soros para detecção de IgG em 223 indivíduos, sendo 123 com leishmaniose visceral (LV), 45 com leishmaniose tegumentar (LT) e 55 com coinfeção LV-HIV. Para testes de reação cruzada, foram utilizadas amostras de pacientes com Doença de Chagas (n = 60) e com Malária (n = 65) e, como grupo controle, foram utilizados soros de 75 de recém-nascidos. Os peptídeos também foram testados em amostras de saliva de 65 pacientes com LV e 40 pacientes com LT, tendo como grupo controle 35 indivíduos saudáveis de área endêmica. Foram realizados também testes diagnósticos utilizando os peptídeos miméticos LC1 e LC2 em soro de 15 indivíduos assintomáticos; 13 indivíduos curados e 15 indivíduos sadios. Com a finalidade vacinal, macrófagos murinos C57BL/6 foram tratados *in vitro* com peptídeos LC1, LC2 e LT (0,6µM; 1,25µM; 2,5µM; 5µM; 10µM) e infectados com *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis* para ensaio de invasão e multiplicação. Foram também realizados ensaios para testar o potencial protetor do peptídeo mimético em camundongos infectados por *L. amazonensis*. Para tanto, os animais foram imunizados e avaliada a carga parasitária, expressão de citocinas, tamanho da lesão, e análise protéica de ligantes. Os ensaios imunoenzimáticos mostraram que tanto soro quanto saliva dos pacientes apresentaram diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) em relação a seus controles, apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 100% para todos os peptídeos, tanto em soro quanto em saliva. Os peptídeos foram capazes de detectar infecção em indivíduos assintomáticos e não apresentaram reação cruzada com Doença de Chagas e Malária, bem como a coinfeção com HIV não interfere na reatividade com os anticorpos para *L. infantum chagasi*, sendo, portanto, uma promissora ferramenta para monitoramento da infecção em regiões endêmicas. Os ensaios com macrófagos mostraram uma redução altamente significativa no número de células infectadas e do número de parasitas internalizados.

Observou-se maior redução de parasitas com o aumento da concentração dos peptídeos. Foi observado que a imunização de camundongos foi capaz de induzir níveis elevados de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF, enquanto os níveis de IL-4 e IL-10 foram reduzidos. Além disso, os animais imunizados apresentaram uma redução da carga parasitária em todos os órgãos (baço, linfonodo, fígado e medula óssea), uma diminuição da lesão da pata na qual os parasitas foram inoculados e fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK e p65/RelA. O ensaio *Western Blot* identificou duas proteínas de *L. amazonensis* (42 kDa) e duas para *Leishmania infantum chagasi* (26 kDa). Assim, os resultados demonstram que os peptídeos sintéticos mimetizam antígenos de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*, revelando-se bons marcadores para diagnóstico imunológico de uso rápido, simples e, principalmente, com alta sensibilidade e especificidade. Finalmente, os dados em macrófagos murinos *in vitro* e *in vivo* abrem perspectivas para o uso desses peptídeos como ferramenta vacinal.

Palavras-chaves: Peptídeos miméticos. Diagnóstico. Vacina. Leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected and endemic disease in Brazil, especially in the Northeast, caused by over 20 species of the *Leishmania* protozoan. Diagnosis includes epidemiological, clinical, and laboratory aspects. Despite the existence of various diagnostic techniques that can be used, none has 100% sensitivity and specificity. Hence, this study aimed to validate three recombinant mimetic peptides (LC1, LC2, and LT) obtained by Phage display, for the development of a specific, sensitive, rapid low-cost immunological diagnosis. Sera for detection of IgG from 223 individuals were used (123 with visceral leishmaniasis (VL), 45 with cutaneous leishmaniasis (CL) and 55 with LV-HIV coinfection). For cross-reaction tests, we used samples of patients with Chagas' disease (n = 60) and Malaria (n=65), and control group (n= 75 sera from newborns). The peptides were also tested in saliva from patients with LV (n = 65), with LT (n = 40), and healthy individuals from an endemic area were used as control (n =35). Diagnostic tests using the mimetic LC1 and LC2 peptides were carried out in serum of 15 asymptomatic subjects; 13 healed individuals and 15 healthy subjects. To test the ability of the mimetic peptides to improve the immune response against *Leishmania*, murine macrophages C57BL/6 were treated *in vitro* with peptides LC1, LC2, and LT (0,6µM; 1,25µM; 2,5µM; 5µM, 10µM) and infected with *L. infantum chagasi* and *L. amazonensis* for invasion and multiplication assays. We also evaluated the potential protective action of mimetic peptide in mice infected with *L. amazonensis*. Therefore, animals were immunized and the parasite load, expression of cytokines, lesion size, and protein analysis binders were evaluated. The immunoassays showed that both serum and saliva of the patients exhibited a highly significant difference (p < 0.0001) compared to their controls, with 100% sensitivity and 100% specificity. Peptides were able to detect infection in asymptomatic subjects and showed no cross-reactivity to either Chagas' disease or malaria, as well as co-infection LV-HIV did not interfere with responsiveness to LV antibodies, therefore being a promising tool for monitoring regions where these diseases occur. Tests using macrophages showed a highly significant reduction in the number of infected cells and of internalized parasites. A further reduction of parasites with increasing concentration of peptide was observed. Furthermore, it was observed that immunization of mice was able to induce high levels of IFN- γ , IL-12, GM-CSF and IL-10, while IL-4 did not change compared to the control. Additionally, immunized animals showed a reduction in parasitic load in all

organs (spleen, lymph node, liver, and bone marrow), a decrease in paw lesion in which parasites were inoculated and phosphorylation of ERK1/2, JNK and p65/RelA. *Western Blot* assay identified two proteins to *L. amazonensis* (42 KDa) and two to *Leishmania infantum chagasi* (26 KDa). Thus, our results demonstrate that mimetic peptides act as antigens of *L. infantum chagasi* and *L. amazonensis*, being good immune markers for a simple and fast diagnosis with high sensitivity and specificity. Finally, data in murine macrophages *in vitro* and *in vivo* open perspectives for their use as a vaccine tool.

Keywords: Mimetic peptides. Diagnosis. Vaccine. Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Ciclo evolutivo do parasita *Leishmania* spp.....31
- Figura 2 Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso M13 ilustrando as proteínas do capsídeo viral: p9, p7, p8, p6 e p3 (FUKUNAGA E TAKI, 2012).....43
- Figura 3 Representação esquemática do *biopanning* de peptídeos utilizando como alvo anticorpos presentes no soro.....45
- Figura 4 Representação das quatro cadeias estruturais de IgG. Fonte: BARBAS, et al., 2001.....46
- Figura 5 Detecção de anticorpos por ELISA utilizando peptídeos miméticos LC1 e LC2. **A.** Reatividade de LC1 com soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV) e recém-nascidos (CN). **B.** Curva ROC apresentando a sensibilidade e especificidade. **C.** Reatividade de LC2 com pacientes de leishmaniose visceral e recém-nascidos. **D.** Curva ROC. **E.** ELISA utilizando extrato proteico em soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV) e recém-nascidos (CN). **F.** Curva ROC apresentando a sensibilidade e especificidade.....63
- Figura 6 **A. C.** Soros de pacientes com coinfeção LV-HIV e grupo de recém-nascidos usado como controle negativo (CN). Os soros foram testados individualmente quanto à sua capacidade para se ligar ao peptídeo sintético LC1 e LC2. A linha horizontal corresponde ao valor *cut-off* 0,11. **B.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e a especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor $p < 0,0001$ são indicados no gráfico. **E.** ELISA utilizando extrato proteico contra soro de pacientes com leishmaniose visceral (LV) e recém-nascidos (CN). **F.** Curva ROC apresentando a sensibilidade e especificidade.....64
- Figura 7 **A e C:** Soros de grupos assintomático, curado e sadio testados quanto à sua capacidade para se ligar ao peptídeo sintético LC1 e LC2. A linha horizontal corresponde o valor *cut-off* 0,11. **B.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor $p < 0,0001$ são indicados no gráfico.....65
- Figura 8 **A** Detecção de anticorpos por ELISA utilizando o peptídeo LT em soros individuais de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT) e grupo de recém-nascidos usado como controle negativo (CN). A linha horizontal corresponde ao valor *cut-off* 0,11. **B.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva

- (AUC) e o correspondente valor $p < 0,0001$ são indicados no gráfico. **C.** ELISA utilizando extrato proteico com de leishmaniose tegumentar (LT) e recém-nascidos (CN). **D.** Curva ROC apresentando a sensibilidade e especificidade. **B.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor estão indicados no gráfico.....66
- Figura 9 **A. C.** Amostras de saliva de pacientes com leishmaniose visceral (LV) e grupo controle de amostras de indivíduos de área endêmica (CN). As salivas foram testadas individualmente quanto à sua capacidade para se ligar ao peptídeo sintético LC1 e ao peptídeo LC2. A linha horizontal corresponde o valor *cut-off* 0,16 (LC1) e 0,13 (LC2). **B. D.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e a especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor estão indicados no gráfico.....67
- Figura 10 **A.** Amostras de salivas de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT) e grupo controle de amostras de indivíduos de área endêmica (CN). As salivas foram testadas individualmente quanto à sua capacidade para se ligar ao peptídeo sintético LT. A linha horizontal corresponde o valor *cut-off* 0,12. **B.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor estão indicados no gráfico.....68
- Figura 11 **A. C. E.** Testes de reação cruzada com amostras de soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV), Malária (ML), Doenças de Chagas (DC), Hanseníase Tuberculoide (HT) e controle negativo (CN). A linha horizontal corresponde o valor *cut-off* 0,11. Teste de reação cruzada com amostras de soros de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT), Hanseníase Virchowiana (HT) e controle negativo (CN). **B. D. F.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor estão indicados no gráfico.....69
- Figura 12 Ensaio de viabilidade celular pela resazurina em macrófagos C57BL/6 tratados com os peptídeos LC1, LC2, LT e IRREL. maior redução de células infectadas em relação as demais.....70
- Figura 13 Macrófagos murinos C57BL/6 tratados com o peptídeo LC1 e Irrelevante por 2 horas nas concentrações 0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM , controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). **A.** Infecção por 4 horas com formas amastigotas (5:1) de *Leishmania infantum chagasi*. **B.** Índice de infecção (número de parasitos em 100 células infectadas). **C.** Infecção por 4 horas com formas promastigotas (5:1) de *Leishmania infantum chagasi*. **D.** Índice

de infecção. Os dados representam média e desvio-padrão. *Two way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$). ** indica maior redução de células infectadas e de parasitos internalizados em relação as demais concentrações ($p < 0,0001$).....71

Figura 14 Macrófagos murinos C57BL/6 tratados com o peptídeo LC2 e IRREL (irrelevante) por 2 horas nas concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M ; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). **A.** Infecção por 4 horas com formas amastigotas (5:1) de *L.infantum chagasi*. **B.** Índice de infecção (número de parasitos em 100 células infectadas). **C.** Infecção por 4 horas com formas promastigotas (5:1) de *L. infantum chagasi*. **D.** Índice de infecção. **A. B.** Com o aumento da concentração diminuiu a invasão dos parasitos. **C. D.** O índice de infecção diminui com o aumento da concentração do peptídeo. Os dados representam média e desvio-padrão. *Two way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$). ** indica maior redução de células infectadas em relação as demais concentrações ($p < 0,0001$).....72

Figura 15 Macrófagos murinos C57BL/6 tratados com o peptídeo LT e IRREL (irrelevante) por 2 horas nas concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). **A.** Infecção por 4 horas com formas amastigotas (5:1) de *L. amazonensis*. **B.** Índice de infecção (número de parasitos em 100 células infectadas). **C.** Infecção por 4 horas com formas promastigotas (5:1) **D.** Índice de infecção. **A. B.** Com o aumento da concentração diminuiu a invasão dos parasitos. **C. D.** O índice de infecção diminui com o aumento da concentração do peptídeo. Os dados representam média e desvio-padrão. *Two way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras iguais: Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$). ** indica maior redução de células infectadas e de parasitos internalizados em relação as demais concentrações ($p < 0,0001$).....73

Figura 16 Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com amastigotas (1:1) de *L.infantum chagasi* expostos ao peptídeo LC1, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). A redução da multiplicação do parasita com o aumento da concentração em todos os tratamentos (A. B. C. D). *Two-way* ANOVA; teste de

Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.....74

Figura 17 Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com promastigotas (1:1) de *L. infantum chagasi* tratados com o peptídeo LC1, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM controle negativo (CN), controle de veículo (CV). A redução da multiplicação do parasita com o aumento da concentração em todos os tratamentos. *Two way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações..... 75

Figura 18 Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com amastigotas (1:1) de *L. infantum chagasi* tratados com o peptídeo LC2, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). A redução da multiplicação do parasita com o aumento da concentração em todos os tratamentos. *Two way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.....76

Figura 19 Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com promastigotas (1:1) de *L. infantum chagasi* tratados com o peptídeo LC2, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM controle negativo (CN), controle de veículo (CV). *Two way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.....77

Figura 20 Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com amastigotas (1:1) de *L. amazonensis* tratados com o peptídeo LT, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM , controle negativo (CN), controle de veículo (CV). Os dados representam média e desvio-padrão. *Two way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as

- concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.....78
- Figura 21 Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com promastigotas (1:1) de *L. amazonensis* tratados com o peptídeo LT, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo (CN), controle de veículo (CV). Os dados representam média e desvio-padrão. *Two way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.....79
- Figura 22 Imunogenicidade do clone 10B associada com saponina contra *L. amazonensis*. Células de baço obtidas a partir de camundongos após 30 dias de imunização com o clone 10B e os controles. Cada barra representa a média \pm DP dos dados de quatro camundongos. Diferenças estatisticamente significativas em IFN- γ , IL-12, GM-CSF e IL-10 entre o grupo clone 10B mais saponina e os controles foram observadas (* $p < 0,005$).....80
- Figura 23 Quantificação da carga parasitária após 10 semana da infecção por *L. amazonensis* nos órgãos: baço (A), fígado (B), medula óssea (C), linfonodo (D) e patas infectadas (E). Cada barra representa a média \pm DP dos dados de cada camundongo ($n=4$). Diferenças significativas da carga parasitária entre o grupo tratado com clone 10B mais saponina e os grupos controles (* $p < 0,0001$). N.D. Não detectado. (F) Desenvolvimento da lesão na pata de camundongos imunizados com clone 10B associado com saponina após o desafio com *L. amazonensis*. Os dados representam a média \pm DP de quatro camundongos em cada grupo. Diferenças estatisticamente significativas na lesão da pata entre o grupo tratado com clone 10B mais saponina e os grupos controle foram observadas (* $p < 0,005$).....81
- Figura 24 Resposta imune celular induzida pelo clone 10B associado com saponina após a infecção. As células do baço obtidas de camundongos imunizados com o clone 10B associado a saponina e os controles. Cada barra representa a média \pm DP dos dados de quatro camundongos. Diferenças estatisticamente significativas para GM-CSF, IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 entre os níveis do clone 10B grupo mais saponina e os grupos controles foram observadas (* $p < 0,0001$).....82

- Figura 25 Níveis de fosforilação de ERK1/2, JNK e p65/RelA de proteínas extraídas da pata do camundongo imunizado com o clone 10B associado com saponina seguido do desafio com *L. amazonensis*. **A:** Extrato das proteínas P-ERK1/2, anti-JNK ou anti P-p65 (topo), ou anti- β -actina. **B:** Análise densitométrica através do *software* LabImage software. Os resultados são expressos como a média de três camundongos. * $p < 0,05$ quando comparado com camundongos tratados com PBS.....83
- Figura 26 Western Blot das proteínas ligantes aos anticorpos recombinantes 2F, 7H, referentes à *L. amazonensis*, de aproximadamente 42 kDa; 10E e 12 C referentes à *L. infantum chagasi* aproximadamente 26kDa.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas e socioeconômicas dos grupos de pacientes atendidos no Hospital Presidente Vargas, São Luís - MA no período de 2012 a 2015.....	61
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS

GP63	Glicoproteína
µg	Micrograma
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de variância
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Albumina de soro bovino
D.O	Densidade óptica
DAT	Teste de aglutinação direta
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECL	Reagente de detecção quimioluminescente
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
Fab	Fragmento de ligação com o antígeno
FBS	Soro bovino fetal
Fv	Fragmento variável do anticorpo
GPI	Âncora de Glicofosfoinositol
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN-γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL – 10	Interleucina -10

IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina -13
IL-4	Interleucina - 4
iNOS	Óxido nítrico sintetase
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
KDa	Kilodalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
M13	Bacteriófago filamentosos
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenosina
NaF	Fluoreto de Sódio
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânio superóxido
OH ⁻	Radical hidroxil
APC	Célula apresentadora de antígeno
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	O-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio

scFv	Fragmentos variáveis em cadeia única
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio
SLA	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
T CD4	Linfócito T Auxiliar
T CD8	Linfócito T Citóxico
Th1	Linfócito T Auxiliar
Th2	Linfócito T Auxiliar
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Volts
v/v	Volume por cento
VH	Cadeia pesada do anticorpo
VL	Cadeia leve do anticorpo
μL	Microlitro
μM	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 Leishmaniose: agentes etiológicos, vetores e transmissão	29
2.2 Epidemiologia	32
2.3 Imunologia das leishmanioses	34
2.4 Diagnóstico	36
2.5 Vacinas	41
2.6 Phage Display	42
2.6.1 Phage Display de peptídeos	44
2.6.2 Phage Display de anticorpos	45
3. JUSTIFICATIVA	47
4. OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo Geral	48
4.2 Objetivos específicos	48
5. MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.1 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA	49
5.1.1 Critérios para seleção dos pacientes	49
5.1.2 Amostras	49
5.1.3 Seleção de peptídeos miméticos (ALMEIDA, 2011)	50
5.1.4 Síntese de peptídeos	51
5.1.5 Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos em soro de pacientes ..	51
5.1.6 Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos em saliva de pacientes	52
5.1.7 Análise estatística	52
5.2 ABORDAGEM VACINAL	53
5.2.1 Ensaios <i>in vitro</i>	53
5.2.2 Ensaio <i>in vivo</i> - Potencial protetor do peptídeo mimético 10B contra <i>L. amazonensis</i>	56
5.2.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS LIGANTES	59
6. RESULTADOS	61
6.1 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA	61
6.1.1 Caracterização dos pacientes	61
6.1.2 Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos em soro de pacientes com leishmaniose	62

6.1.3 Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos em saliva de pacientes com leishmaniose.....	66
6.1.4 Reação cruzada dos peptídeos sintéticos.....	68
6.2 ABORDAGEM VACINAL.....	70
6.2.1 Ensaios <i>in vitro</i>.....	70
6.2.2 Ensaio <i>in vivo</i> - Potencial protetor do peptídeo mimético 10B contra <i>L. amazonensis</i>	79
6.3 Identificação da proteína de ligação do anticorpo recombinante.....	83
7. DISCUSSÃO	84
8. CONCLUSÃO.....	91
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXOS.....	111

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções crônicas, não contagiosas, causadas por protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* e são transmitidas de animais infectados para o homem através da picada de flebotomíneos (*Lutzomyia*) fêmeas infectadas. Apresentam um conjunto de sinais clínicos que comprometem pele, mucosas e vísceras e possuem alta letalidade quando não tratadas (CHAPPIUS et al., 2007; KAYE E SCOTT, 2011).

A pele é a porta de entrada da infecção, pela qual o vetor inocula, no momento do repasto sanguíneo, as formas infectantes da *Leishmania*. O parasito possui ciclo heteroxênico, apresentando formas promastigotas flageladas extracelulares e formas amastigotas intracelulares obrigatórias, sendo essas últimas responsáveis por todas as manifestações clínicas da doença (BAÑULS et al., 2007; LEIFSO et al., 2007; READY, 2010).

No gênero *Leishmania* encontram-se aproximadamente 30 espécies, das quais cerca de 20 causam doenças em humanos (READY, 2013). Segundo Pace (2014), as espécies de *Leishmania* nas Américas pertencem a dois subgêneros, de acordo com seu desenvolvimento no vetor: *Viannia* (aderem-se pelo flagelo às paredes do piloro e íleo) e *Leishmania* (apresentam desenvolvimento limitado ao estômago do vetor). No Brasil são reconhecidas pelo menos sete espécies de *Leishmania* responsáveis por doença humana, sendo a forma tegumentar ou cutânea causada principalmente por *L.(V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais raramente, por *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*, enquanto *L. (L.) infantum chagasi* é responsável pela doença visceral. Cada espécie apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, aos vetores, reservatórios, padrões epidemiológicos, distribuição geográfica e à resposta terapêutica (GOMES-SILVA et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2009; MARCILI et al., 2014).

A leishmaniose tegumentar (LT) tem ampla distribuição mundial e permanece endêmica em vastas áreas da América Latina. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 90% dos casos notificados ocorreram em seis países: Afeganistão, Arábia Saudita, Brasil, Irã, Peru e Síria. Estima-se 1,5 milhões de novos casos ocorrem a cada ano em todo mundo (WHO, 2013).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) ocorre nas Américas desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (WHO, 2013). No Brasil há um franco crescimento da endemia, tanto em magnitude quanto em expansão geográfica, com surtos epidêmicos em todas as regiões brasileiras, ocorrendo com maior frequência no grupo populacional maior de 10 anos de idade, representando 90% dos casos (BRASIL, 2014).

A leishmaniose visceral (LV) tem sido relatada em mais de 98 países e territórios. Estima-se que aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos novos ocorrem a cada ano em todo o mundo, de modo que mais de 90% dos casos globais ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2013).

No Brasil, a região Nordeste atualmente é responsável pela grande maioria dos casos de leishmaniose visceral, sendo que os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí detêm a maioria absoluta dos casos humanos da doença no país. Na ilha de São Luís, casos de têm sido relatados desde a década de 1980. Atualmente, a doença se constitui em um dos maiores problemas de saúde pública da região, dada a frequência com que vem acontecendo, sendo o grupo populacional que mais acomete é os menores de 10 anos de idade (BRASIL, 2014).

Segundo Chappuis et al. (2007), para haver estratégias de controle das leishmanioses, é necessário que haja um diagnóstico precoce baseado na pesquisa parasitológica e imunológica e, frequentemente, uma associação destes elementos, monitoramento dos hospedeiros e avaliação dos vetores, uma vez que o diagnóstico não pode ser baseado somente nos sintomas clínicos, pois esta doença compartilha sintomas com outras doenças, como malária, febre tifóide e tuberculose, que ocorrem comumente na mesma área geográfica. Além disso, o número de pessoas infectadas assintomáticas é mais alto que o número de pessoas infectadas que apresentam a doença. Assim é importante saber como as pessoas infectadas vão desenvolver a doença e como elas podem ser diagnosticadas antes de apresentarem as manifestações clínicas (FAKHAR et al., 2008, HIDE et al., 2013).

Vários métodos diagnósticos têm sido propostos, porém nenhum deles apresenta 100% de sensibilidade. O diagnóstico atual ainda é deficiente, baseado em antígenos totais ou em antígenos específicos purificados. Por essa razão alguns trabalhos têm buscado testes mais sensíveis e específicos (ELMAHALLAWY et al., 2014; REITER-OWONA et al., 2015), porém não existe ainda um diagnóstico ouro para as

leishmanioses). Assim, este trabalho tem como objetivo investigar peptídeos miméticos com potencial uso diagnóstico e vacinal para leishmaniose visceral e tegumentar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmanioses: agentes etiológicos, vetores e transmissão

As leishmanioses são um conjunto de doenças zoonóticas e enzoóticas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp. pertencentes à família Trypanosomatidae (KAYE E SCOTT, 2011). De modo geral, de acordo com as manifestações clínicas, as leishmanioses se dividem em tegumentar, na qual há sinais clínicos na pele e mucosas, e visceral, conhecida também como calazar, na qual são afetados os órgãos internos, como fígado e baço, causando esplenomegalia e hepatomegalia (MANSUETO et al., 2014).

O gênero *Leishmania* engloba mais de 30 grupos taxonômicos, dos quais cerca de 20 são infectantes para humanos. São descritas 80 espécies ou sub-espécies de flebotomíneos como vetores de *Leishmania* (GONZÁLEZ et al., 2009). Nas Américas as espécies de *Leishmania* pertencem a dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, os quais subdividem-se em várias espécies. No Brasil as que estão relacionadas com a leishmaniose tegumentar são *L.(V.) braziliensis* – causa lesões cutâneas e/ou mucosas, geralmente agressivas; *L. (V.) guyanensis* – causa predominantemente lesões cutâneas, e *L. (L.) amazonensis* que causa lesões cutâneas, sendo menos severa e tendo cura espontânea e, *L. (L.) infantum chagasi* que causa a doença visceral, forma mais agressiva da doença (CHAPPUIS et al., 2007; GOTO E LINDOSO, 2010, LAINSON, 2010).

A leishmania em seu ciclo de desenvolvimento possui duas formas evolutivas: amastigota, que não possui flagelo externalizado e é encontrada nos tecidos dos vertebrados, tais como linfonodos, fígado, baço e medula óssea, e, a forma promastigota flagelada, que é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (MOUGNEAU, 2011).

A transmissão ocorre através da picada de várias espécies de insetos hematófagos denominados flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, encontradas no Velho Mundo, e as do gênero *Lutzomyia*, nas Américas, as quais transmitem patógenos de animais domésticos e/ou silvestres para humanos, respectivamente, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, através do repasto sanguíneo (OLIVEIRA et al., 2010).

Os flebotomíneos são conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui e tatuquira. São de pequeno porte, 1 a 3 mm de comprimento, corpo e patas cobertas de cerdas, mantêm asas em posição vertical quando em repouso, possuem atividade noturna predominante e suas populações variam de forma sazonal, apresentando elevação da densidade nos meses mais quentes e úmidos (KAYE E SCOTT, 2011).

O inseto ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, ingere macrófagos contendo o parasita na forma amastigota (Figura 1). Durante a digestão do sangue, as formas amastigotas iniciam sua diferenciação para a forma promastigota procíclica, capaz de se dividir e não é infectante. Nesta forma, o parasita ataca o epitélio intestinal prendendo-se a ele. Em seguida, passa por um processo chamado metaciclogênese, convertendo-se para a forma promastigota metacíclica infectante, incapaz de se dividir.

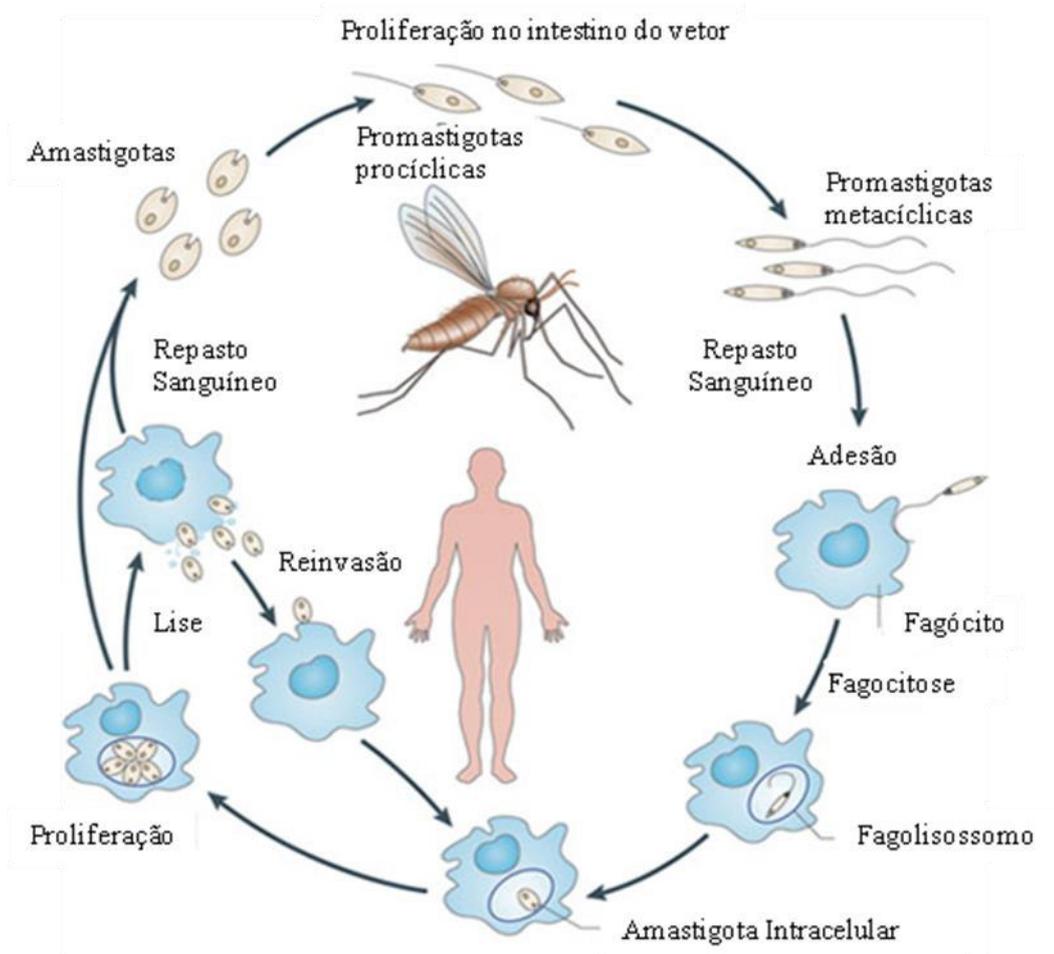
A interação da forma promastigota metacíclica de *Leishmania* com a célula fagocítica ocorre devido a alterações nos seus constituintes da membrana, gerando um denso glicocálix composto por várias moléculas ligadas a uma âncora de glicofosfoinositol (GPI), sendo o lipofosfoglicano (LPG) a molécula mais abundante que desempenha um papel importante no momento da adesão do parasita ao intestino do vetor, além de ser um dos principais fatores de virulência (KAYE E SCOTT, 2011).

Os parasitas se destacam das células intestinais e migram para o aparelho bucal do inseto. Durante o repasto sanguíneo, as formas metacíclicas são inoculadas na pele juntamente com a saliva do vetor. A saliva é necessária para o processo de infecção, pois auxilia na modulação da resposta imunológica local, bem como na localização dos vasos sanguíneos e na vasodilatação (RAMALHO-ORTIGAO et al., 2010). Após o repasto sanguíneo realizado pelo vetor, as promastigotas metacíclicas são reconhecidas na pele por células do sistema fagocitário mononuclear e passam, então, para o meio intracelular formando um vacúolo parasitóforo com lisossomos, onde por influência de enzimas, alterações de pH e temperatura sofrem modificações morfológicas adquirindo a forma de amastigota (DANTAS-TORRES et al., 2012; MONTALVO et al., 2012).

A forma amastigota sobrevive dentro dos compartimentos lisossomais ácidos formados no macrófago e possui inúmeras estratégias para invadir e escapar do sistema de defesa celular. Dessa maneira, o amastigota é capaz de se multiplicar no interior das células fagocíticas até a sua ruptura, passando a infectar outros macrófagos e outras células do sistema imune, além de infectar novos vetores quando presentes no mesmo

habitat do hospedeiro infectado (BAILEY E LOCKWOOD, 2007; KAYE E SCOTT, 2011).

Figura 1. Ciclo evolutivo do parasita *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Kaye e Scott (2011).

A probabilidade de transmissão da doença depende das condições de exposição dos humanos e de animais aos flebotomíneos (GUERRA et al., 2006). O desmatamento e a urbanização são exemplos de alterações que são seguidas por mudanças, principalmente, em reservatórios e na população dos insetos vetores (PINHEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2007). Assim, a distribuição geográfica da doença possui íntima relação com movimentos populacionais, disponibilidade de reservatórios, modificações ambientais, baixa condição econômica e distribuição geográfica do vetor (ABRANTES E SILVEIRA, 2009; DANTAS-TORRES, 2006; COSTA, 2011).

2.2 Epidemiologia

As leishmanioses afetam principalmente as pessoas dos continentes africano, asiático e da América Latina. Segundo o último relatório da Organização Mundial da Saúde de 2015, a leishmaniose é endêmica em 98 países e territórios. Estima-se que haja 350 milhões de pessoas em risco e cerca de 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente, sendo 1,5 milhões de leishmaniose tegumentar e 500 mil de leishmaniose visceral. Este quadro provoca mais de 50 mil mortes por ano. Países como Afeganistão, Bangladesh, Bolívia, Brasil e Índia abrangem noventa por cento de todos os casos de leishmanioses, sendo o Brasil o segundo país de maior prevalência (WHO, 2015).

No Brasil, o Ministério da Saúde (2014) aponta a leishmaniose tegumentar como uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção devido sua magnitude, risco de ocorrências de deformidades, ampla distribuição, com registros de casos em todas as regiões brasileiras. A partir da década de 80, verificou-se aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 25.748 (1995). No período de 1991 a 2010, verifica-se uma média anual de 27.374 casos registrados (16,4 casos/ 100.000 habitantes), com maior densidade de casos nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins, apresentando 13.501 casos. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes.

A leishmaniose visceral, no período de 1990 a 2010 apresentou 3.553 casos registrados, com incidência de 1,88 casos por 100.000 habitantes. A maior concentração de casos foi observada na região Nordeste, com registro de 1.662 casos, que, se não tratados, podem evoluir para óbito em 90% dos casos (BRASIL, 2014). Nesse contexto, tem sido observado um crescimento da endemia, tanto em magnitude quanto em expansão geográfica, com surtos epidêmicos nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na Região Norte. Nas áreas de colonização recente, a expansão está associada à derrubada de matas para construção de estradas, novos núcleos populacionais e ampliação de atividades agrícolas, sendo mais comum na Amazônia Centro-Oeste, onde atinge principalmente a população migrante e os indígenas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; QUARESMA, 2011).

No estado do Maranhão, no período de 2001 a 2010, houve registro da maior ocorrência de leishmanioses da região nordeste, tendo sido notificados 417 novos casos

de leishmaniose tegumentar e 335 casos de leishmaniose visceral para cada 100.00 habitantes (BRASIL, 2014).

A LV é a forma clínica das leishmanioses mais associada ao HIV. A coinfeção *Leishmania*- HIV tem sido considerada como doença emergente em várias regiões do mundo em função da superposição geográfica das duas infecções, em consequência da urbanização das leishmanioses e da ruralização da infecção por HIV (COTA et al., 2014, WHO 2015).

O primeiro caso de coinfeção LV-HIV foi descrito em 1985, no sul da Europa e, atualmente, há registro de sua presença em 35 países. Atualmente, tem sido considerada na Europa, como um problema de saúde pública no qual a proporção de indivíduos com LV e infectados pelo HIV chega a 77% (RABELLO et al., 2003; COTA et al., 2014).

No Brasil, o primeiro caso de coinfeção LV-HIV foi descrito em 1987, com aumento progressivo de casos nos anos seguintes. As regiões com maior percentual de casos de coinfeção foram o Nordeste e o Sudeste, onde justamente predominam, respectivamente, os casos de LV e HIV. Estima-se que 10% dos portadores de HIV apresentem infecção assintomática por *Leishmania* sp. e, destes, 2% a 9% dos co-infectados desenvolverão LV clinicamente (SOUSA-GOMES et al., 2011).

No Maranhão foram documentados 31 casos de coinfeção LV-HIV no período de 2000 a 2005. Os dados do Estado são preocupantes tanto em relação à LV quanto à infecção pelo HIV. A LV foi registrada em 54,8% dos municípios maranhenses e casos de AIDS em 64,1% (MARANHÃO, 2009).

A razão da expansão das leishmanioses dos últimos anos é multifatorial. Entre seus fatores, aspectos sociais e ambientais relacionam-se à ocorrência e urbanização das leishmanioses (WHO, 2015). Os rápidos movimentos e migração intensa da população rural para a periferia urbana, ligada à pobreza, à precariedade das habitações com condições domésticas e peridomésticas sanitárias (por exemplo, falta de gestão de resíduos, esgotos abertos) favorecem os reservatórios silvestres e domésticos para áreas até então sem transmissão de leishmaniose e contribuem, dessa forma, para a manutenção do ciclo da doença. Além disso, o estado nutricional deficiente aumenta a probabilidade e progressão da infecção, bem como o estado de imunossupressão decorrente da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e de outras patologias (KAYE E SCOTT, 2011; PACE, 2014; WHO, 2015).

As alterações ambientais antropogênicas como a degradação da cobertura vegetal, a construção de barragens, exploração da madeira e minério promovem alterações microecológicas que afetam o vetor, o parasita e o hospedeiro reservatório, assim como o próprio processo de urbanização de médias e pequenas cidades que acabam por domesticar o ciclo de transmissão da leishmaniose (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Podem também ocorrer surtos epidêmicos sazonais em áreas com pequenos focos residuais de mata primária, onde o homem costuma desenvolver atividades ligadas à agricultura, assim, a infecção apresenta ciclos sazonais quando a densidade populacional do flebotomíneo está elevada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; QUARESMA, 2011).

2.3 Imunologia das Leishmanioses

O hospedeiro imunocompetente é capaz de ativar a resposta inflamatória inata e adquirida que irão estabelecer o grau de expressão da doença. Os neutrófilos desempenham um importante papel nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania*, pois são as primeiras células que capturam os parasitos no sítio de infecção e atuam como pontes entre a *Leishmania* e sua célula hospedeira final, o macrófago (PETERS E SACKS, 2009).

Os macrófagos são ativados pelos linfócitos T auxiliares (*helper*), mas há um reconhecimento inicial do parasito por meio de receptores presentes na membrana do macrófago e ligantes específicos de promastigota de *Leishmania*, principalmente, glicoproteína de 63 KDa (GP63), lipofosfoglicano (LPG) e receptores de fosfatidilserina (TRIPATHI E GUPTA, 2003; ROBINSON, 2004; TANAKA et al., 2007).

A gp63 é uma metaloproteinase, que é distribuída de forma abundante na superfície de promastigotas, atuando como importante fator de virulência durante a interação com a célula hospedeira e também, com o sistema complemento, diretamente sobre a proteína C3, inibindo a cascata imunológica. Em amastigotas, a GP63 está presente em menor quantidade e degrada enzimas lisossomais por apresentar ótima atividade em meio ácido (HANDMAN E BULLEN, 2002; RODRÍGUEZ, 2003; JOSHI, 2002; CUNNINGHAM et al., 2002).

O LPG é um glicolípido expresso na superfície de membrana dos parasitos, e também determinante de virulência. Confere resistência a *Leishmania* à ação lítica do

complemento e, dependendo da espécie, contribui para o estabelecimento da infecção dentro macrófago, criando condições propícias para a diferenciação de promastigotas em amastigotas (HANDMAN E BULLEN, 2002; RASMUSSEN E DESCOTEAUX, 2004).

Após a entrada do parasito no macrófago, o LPG é capaz de inserir-se na bicamada lipídica fazendo com que haja uma desestruturação da membrana culminando com a inibição da formação do complexo NADPH oxidase (DERMINE et al., 2005; LODGE et al., 2006).

A NADPH oxidase é um complexo enzimático com subunidades distribuídas pela membrana plasmática e pelo citosol que, após a ativação celular, se unem e formam um complexo capaz de reduzir o oxigênio (O_2) em ânions superóxidos (O_2^-) (VAN ASSCHE et al., 2011).

Posteriormente, os O_2^- são convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espontaneamente ou por meio da enzima superóxido dismutase (SOD). Além das espécies reativas de oxigênio, os macrófagos também produzem alguns radicais intermediários, principalmente óxido nítrico (NO), através da ativação da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS). A iNOS é uma enzima que converte a arginina em NO e L-citrulina quando a célula hospedeira é ativada. A expressão da iNOS é ausente em macrófagos residentes, sendo ativada, principalmente por lipopolissacarídeo (LPS) e interferon-gama ($IFN-\gamma$). Esse processo de produção de radicais (ROS, $O_2^-H_2O_2$, NO, OH $^-$) é chamado de “burst oxidativo” que auxiliará no combate ao parasita e defesa do organismo (VAN ASSCHE et al., 2011; FARIAS et al., 2013; SARDAR et al., 2013; FILARDY et al., 2014; OLEKHNOVITCH et al., 2014; OLEKHNOVITCH E BUSSO, 2015).

A fosfatidilserina é um fosfolípido presente na membrana plasmática das formas promastigotas possui alta especificidade com receptores na superfície de macrófagos. É encontrada externalizada na superfície de células apoptóticas estimulando a atividade fagocítica do macrófago, porém inibindo sua reação inflamatória (WANDERLEY et al., 2006). Desta forma, a entrada do parasito por receptores de células apoptóticas do hospedeiro favorece a inibição da ativação da resposta microbicida, o que pode ser o fator crítico para a sobrevivência de promastigotas em fagócitos (NADERER E MCCONVILLE, 2008).

As formas promastigotas ao serem aderidas à superfície celular dos macrófagos são fagocitadas formando um fagolisossomo, dando origem ao vacúolo parasitóforo (PETERS E SACKS, 2009). No interior do vacúolo parasitóforo ou fagolisossomo, a fim de evitar a sua degradação, estabelecem condições favoráveis para a sua proliferação e diferenciação das formas promastigotas em amastigotas (CUNNINGHAM, 2002).

A resposta imunológica do hospedeiro vertebrado envolve um complexo sistema com células apresentadoras de antígenos (APCs), células T CD4⁺ e liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, como interleucina-12 (IL-12), IFN- γ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Esta resposta Th1 previne a manifestação das doenças após um estado latente e o estabelecimento da fase crônica (STOBIE et al., 2000).

As células T CD8⁺ apresentam importante papel por produzirem IFN- γ e promoverem o maior desenvolvimento de células T CD4⁺ auxiliando na cura da doença (STOBIE, 2000; MURRAY, 2005).

Ao longo do estabelecimento da leishmaniose também são produzidas citocinas reguladoras que agem balanceando a resposta imunológica como interleucina - 4 (IL-4), interleucina -10 (IL-10) e interleucina -13 (IL-13), todas associadas com a resposta do tipo 2 (Th2), capazes de interferir na resposta Th1, inibindo macrófagos e, assim, favorecendo a infecção (MURRAY et al., 2002).

Infecções por *Leishmania* são caracterizadas pelo surgimento de anticorpos anti-*Leishmania* no soro. Em humanos, relevou elevados níveis de imunoglobulinas IgG, IgM, IgE e subclasses de IgG no curso da doença. IgG falha na proteção contra o patógeno para a progressão da doença (ATTA et al., 2004; MILES et al., 2005). Durante a fase ativa da doença há elevado nível de anticorpos e a consecutiva queda após o tratamento e cura (SHARMA E SINGH, 2009).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Geralmente a associação de alguns desses elementos é necessária para que o diagnóstico seja estabelecido. Apesar de existir várias técnicas que podem ser utilizadas, nenhum dos testes disponíveis apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (ELMAHALLAWY et al., 2014).

O diagnóstico clínico é complexo, pois as leishmanioses apresentam sinais e sintomas que são comuns a outras doenças presentes em áreas, nas quais ocorre leishmaniose, como por exemplo, doença de Chagas, malária, esquistossomose, febre tifóide, hanseníase (SUNDAR et al., 2002; CARVALHO et al., 2003; SUNDAR, 2003; CHAPPUIS et al., 2007; VAISH, 2012).

A leishmaniose tegumentar pode ser identificada com base na lesão (ou espectro de lesões) associada à anamnese, onde dados epidemiológicos são de grande importância, pois as manifestações clínicas dependem de alguns fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida com seu hospedeiro. As lesões são exclusivas na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor, para qualquer das espécies de *Leishmania* (COSTA et al., 2002; GONTIJO E CARVALHO, 2003; ANDRADE et al., 2005; FAKHAR et al., 2008).

A lesão primária geralmente é única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotômíneo ou na disseminação local possam gerar um número elevado de lesões. Após um período de incubação de 10 dias a três meses, uma pápula eritematosa progride lentamente para o nódulo. Acompanha-se de adenopatia regional, com ou sem linfangite, em 12 a 30% dos casos. Com a evolução, ganha destaque o notável poliformismo das lesões sendo possível encontrar formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide. São frequentes as ulcerações com bordas elevadas e fundas com tecido de granulação, configurando a clássica lesão com borda em moldura. Esse quadro normalmente é assintomático (reservatório silencioso), predominando nas áreas do corpo descobertas e se instala em pacientes de áreas endêmicas ou que estiveram lá recentemente (COSTA et al., 2002; FAKHAR et al., 2008; SIGH E RAMESH, 2013).

Na maioria dos casos, a infecção progride e, após um período de latência clínica de vários meses de duração, surgem as lesões cutâneas e/ou mucosas, consequentes à disseminação hematogênica e/ou linfática do parasita. Assim, a doença é mais difícil de ser clinicamente diagnosticada sendo necessário recorrer aos métodos laboratoriais. (ANDRADE et al., 2005; TRINDADE et al., 2015).

Os sintomas clínicos da leishmaniose visceral são febre baixa recorrente, envolvimento linfático, anemia, leucopenia, hepatoesplenomegalia e caquexia, combinados com a história de residência em uma área endêmica (ASSIS et al., 2008).

A rotina laboratorial é realizada através do exame direto de esfregaços ou impressão de aposição, isolamento de cultura, inoculação de animais, da análise histopatológica das lesões (LT), reação de cadeia polimerase – PCR e de testes de imunodiagnósticos (detecção da resposta imune celular, detecção de anticorpos e do antígeno em imunocomplexos) (READY, 2014).

O diagnóstico parasitológico das leishmanioses depende da identificação das formas amastigotas da lesão (LT) ou de amostras colhidas por punção de medula óssea, baço, fígado e linfonodos (LV), coradas com Giemsa, Wright ou Leishman e visualizadas em microscopia óptica ou por isolamento das formas promastigotas em meio de cultura. Esta técnica possui baixa sensibilidade (50 – 70%), mas ainda é considerado o padrão ouro (SUNDAR E RAI, 2002, SAMPAIO et al., 2009).

A cultura de promastigotas *in vitro* permite à identificação da espécie presente na lesão, entretanto, as espécies de *Leishmania* apresentam capacidade de crescimento variável em cultura e requer uma série de condições laboratoriais, pessoal treinado, sendo necessário mais de 10 dias para aquisição de um número suficiente de promastigotas para as investigações. A sensibilidade desse método está em torno de 50%, para casos crônicos, enquanto com baixa carga parasitária da lesão, há uma sensibilidade ainda mais reduzida desse método (SAMPALIO et al., 2009).

Outra forma de diagnóstico parasitológico é a inoculação de material da biópsia cutânea em animais de laboratório, de preferência hamsters. Além do longo tempo necessário para a evolução da lesão (em média 2 a 9 meses) e da necessidade de laboratório adequado, a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* (GONTIJO E CARVALHO, 2003).

A análise histopatológica pode apresentar uma maior sensibilidade (70 – 100%), mas pode diminuir a sensibilidade, pois a chance de encontrar o parasita é inversamente proporcional ao tempo de duração da lesão. A sensibilidade 100% pode ser observada nos dois primeiros meses de evolução da doença, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses. Assim, a maioria dos casos de LT é identificada e diagnosticada na fase crônica (MONTALVO et al., 2012).

O teste pela reação em cadeia da polimerase é outra ferramenta que pode ser utilizada para diagnóstico laboratorial molecular, procedimento rápido, com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade, apresenta custo reduzido e podem ser avaliados em quantidades reduzidas de DNA (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

Um dos alvos para o diagnóstico é a amplificação do gene correspondente ao kDNA de *Leishmania* spp., que amplifica fragmentos de 100 a 150 pares de bases de regiões conservadas, comum a todas as espécies de *Leishmania*, e regiões variáveis, que amplificam fragmentos que variam de 700 a 1000 pares de bases de acordo com a espécie (SILVA et al., 2012).

A técnica PCR pode se aproximar do padrão-ouro devido às novas técnicas de extração de DNA. Pesquisas demonstram, para este teste, especificidade de 100% e sensibilidade global entre 92 e 98% (POURMOHAMMADI et al., 2010).

O PCR convencional demanda mais tempo e apresenta dados apenas qualitativos. Nos ensaios com PCR em tempo real, os produtos da reação são analisados no momento da realização da ciclagem e os resultados são tanto qualitativos como quantitativos. Esta técnica vem sendo utilizada por diversos autores, em amostras provenientes de cães e de humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à carga parasitária, interação hospedeiro-parasito e monitoramento da terapia (NICOLAS et al., 2002; MARY et al., 2004; MORTARINO et al., 2004).

A PCR em tempo real é outra ferramenta que pode ser utilizada para diagnóstico laboratorial molecular, com determinação da carga parasitária (VALASEK E REPA, 2005; NEITZKE-ABREU et al., 2013). Estudos epidemiológicos realizados para a determinação da taxa de infecção em flebotomíneos com PCR convencional mostram baixas taxas de infecção variando de 0,4% a 3,9% (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2004; OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2006; SILVA et al., 2010).

Devido à ampla variedade de alvos e iniciadores disponíveis no diagnóstico molecular, ainda não há um procedimento padrão-ouro, o que dificulta a inserção desse ensaio na rotina dos serviços de saúde (SILVA et al., 2010).

A detecção da imunidade celular através da reação intradérmica - Intradermoreação de Montenegro (IDRM) tem sido utilizada para diagnóstico desde 1964, e atualmente é disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). É um teste fundamentado na reação de hipersensibilidade tardia (ou tipo IV) e sua interpretação deve ser cuidadosa, uma vez que seu resultado pode ser negativo nas primeiras semanas após surgimento da lesão cutânea em humanos, em contrapartida podem ser obtidos resultados falsos positivos quando esse teste é repetido com intervalo de poucas semanas (GONTIJO E CARVALHO, 2003; BRASIL, 2010).

Toledo et al. (2001) utilizaram uma preparação do antígeno padronizado pelo Ministério da Saúde, que foi injetado por via intradérmica no antebraço humano. Foram realizadas leituras com 48h após injeção e consideraram as reações positivas na presença de endurecimento maior que 5 mm no local da aplicação, identificando positividade em 88% dos casos, confirmando a validade deste teste como uma ferramenta útil de diagnóstico na leishmaniose cutânea em humanos. Pedras et al. (2003) realizaram metodologia similar, mas verificaram as leituras no local da injeção após 72 h, e foram consideradas positivas as reações cutâneas com tamanho igual ou maior que 5 mm.

O diagnóstico sorológico detecta anticorpos anti-*Leishmania* e inclui a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de aglutinação direta (DAT) (READY, 2014; BHATTACHARYYA et al., 2014).

O ensaio ELISA consiste na reação de anticorpos presentes no soro com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos são adicionados posteriormente. Os antígenos usados são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitas intactos ou moléculas solúveis e apresentam reação cruzada com outras espécies da família Trypanosomatidae, assim, é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças. A presença de anticorpos permite a realização de grande número de exames em curto espaço de tempo, rápido, sensível, de fácil execução (READY, 2014; BRASIL, 2013).

O teste de aglutinação direta é um teste rápido apropriado para o diagnóstico de LV com base em formas promastigotas de *L. donovani* ou *L. infantum*. Este teste foi descrito por Allain e Kagan em 1975 e é de fácil execução, baixo custo, com sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100% (PEDRAS et al., 2008; TER et al., 2009).

O DAT é indicado para trabalhos de campo, mas necessita de um laboratório equipado para a execução e período de incubação. O teste é semi-quantitativo e as amostras de soro, sangue ou urina são diluídos e misturados às partículas antigênicas de promastigotas mortas em sua forma íntegra. Após um período de incubação, a aglutinação se completa, caso os anticorpos contra o protozoário estejam presentes, sendo a reação de aglutinação visível a olho nu (CHAPPUIS et al., 2006; TER HOST et al., 2009). Este diagnóstico tem sido avaliado em áreas endêmicas e é considerado de

primeira linha em centros de referência para LV no Sudão, diminuindo o número de aspirados em torno de 80% (RITMEIJER et al., 2006; LOCKWOOD E SUNDAR, 2006, TER HORST et al., 2009).

A leishmaniose visceral pode ser diagnosticada pelo teste imunocromatográfico para detectar a presença de anticorpos contra o antígeno de *Leishmania* K39 que contém 39 aminoácidos repetitivos da proteína cinesina. Inicialmente, o rk39 foi introduzido para ser utilizado no ELISA e posteriormente no formato de fita (CHAPPUIS et al., 2003; BOELAERT et al., 2008; MUELLER et al., 2014). O rk39 mostrou variação de sensibilidade e especificidade em diferentes populações. Na Índia, apresentou sensibilidade 100% e especificidade 93% - 98%, no Brasil sensibilidade 90% e especificidade 100%. Na Europa, foi positivo em 71,4% dos casos, no Sudão apresentou 67% de sensibilidade. A diferença de sensibilidade pode ser observada devido a diferenças dos anticorpos presentes em diferentes grupos étnicos (BOELAERT et al., 2014).

A detecção de IgE antileishmania realizado em paralelo com IgG antileishmania pelo ELISA é considerado um marcador de infecção para *Leishmaniose chagasi* e não um marcador da doença. Estes anticorpos não têm função protetora da doença e estão associados a processos infecciosos como infecções virais, helmintíases e protozooses, porém estudos tem demonstrado a elevação dos níveis de IgE total em pacientes com leishmaniose visceral (NASCIMENTO et al., 2006).

2.5 Vacinas

Nas últimas décadas, tem-se buscado desenvolver vacina contra a leishmaniose, mas nenhuma ainda está em uso ativo (SRIVASTAVA et al., 2016). Em geral, as vacinas que estão em fase de desenvolvimento, podem ser divididas em três categorias: 1 – vacinas vivas atenuadas de *Leishmania*, incluindo parasitas geneticamente modificados; 2 – vacinas de proteínas recombinantes; 3 – vacinas de DNA (SILVESTRE et al., 2008; IBORRA et al., 2008; CARRIÓN et al., 2011; NICO et al., 2014; KUMAR E SAMANT et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016).

A “leishmunização” é a estratégia de imunização mais bem sucedida em humanos desenvolvendo imunidade duradoura após infecção induzida com parasitas viáveis não atenuados, mas foi interrompida devido ao não controle das lesões de longa duração na pele e a propagação do HIV. O uso é limitado a uma vacina registrada no

Uzbequistão (BRETON et al., 2005; KHAMESIPOUR et al., 2014; RAFATI et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2016).

Com a proibição do uso da “leishmunização” foram desenvolvidas vacinas de segunda geração utilizando proteínas sintéticas ou recombinantes referentes a antígenos de *Leishmania* e frações purificadas dos parasitos nativos (STÄGER et al., 2000, ZANIN et al., 2007, RAMIREZ et al., 2013; BAHARIA et al., 2015).

As proteínas podem ser testadas isoladas ou em combinação, sendo que na maioria das vezes é necessário utilizar um adjuvante. Apesar de diferentes pesquisas utilizando antígenos recombinantes já terem sido realizados na intenção de desenvolver uma vacina contra leishmaniose, alguns ofereceram um grau considerável de proteção e podem ser utilizadas como vacinas terapêuticas e/ou profiláticas (DUTHIE et al., 2012; RAMAN et al., 2012; NAGILL et al., 2011; COLER et al., 2015; BEAUMIER et al., 2013; GILLESPIE et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016).

As vacinas de DNA ou vacinas genéticas capacitam a produção de antígenos permitindo a expressão de proteínas em célula de mamíferos após a introdução das construções de DNA codificante da proteína a ser testada, diferentes antígenos têm sido testados contra leishmaniose (DUMONTEIL et al., 2007; ZANIN et al., 2007; DEY et al., 2009; MASIH et al., 2011; KUMAR E SAMANT et al., 2016)

2.6 Phage Display

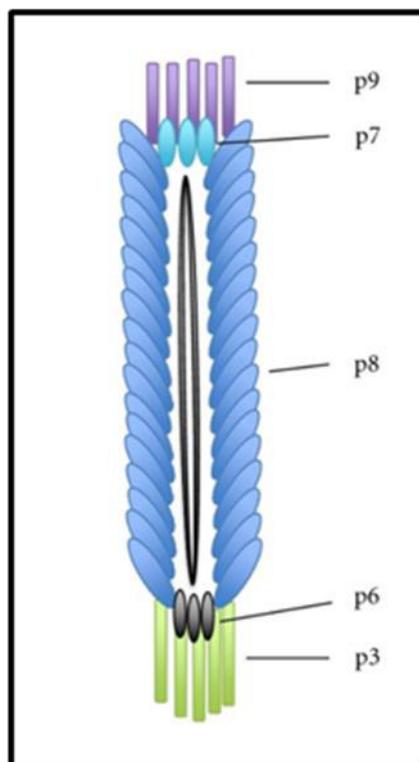
A tecnologia de *Phage display* ou expressão de biomoléculas em fagos é uma tecnologia desenvolvida por Smith (1985) utilizada na descoberta de testes diagnósticos, fármacos e vacinas, sendo bastante útil na caracterização antigênica, pois identifica peptídeos ou proteínas envolvidos diretamente na resposta imune a agentes infecciosos (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002; HELL et al., 2009).

Essa tecnologia é baseada no uso de um fago filamentosso (M13), um bacteriófago que infecta bactérias *gram* negativas, como a *Escherichia coli* (BENHAR, 2001).

Os bacteriófagos são formados por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (p3, p6, p7, p8 e p9) (FUKUNAGA e TAKI et al., 2012) (Figura 2). Destas cinco proteínas, existem aproximadamente 2.800 cópias da p8 e cinco cópias da p3. Nesse sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da

capa protéica do fago (ZANCONATO et al., 2011). Devido à baixa representatividade da p3 em relação à p8, as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na p3 são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas as bibliotecas fusionadas a p8 (KEHOE E KAY, 2005). Assim, a utilização do bacteriófago filamentosso M-13 para construção de uma biblioteca randômica de sequências de peptídeos fusionados à proteína p3 permite à realização de um “screening” de peptídeos ligantes a molécula alvo de forma mais específica (PLOSS et al., 2014).

Figura 2: Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso M13 ilustrando as proteínas do capsídeo viral: p9, p7, p8, p6 e p3.



Fonte: FUKUNAGA E TAKI, 2012.

Uma das vantagens do uso do bacteriófago M13 utilizado para expressar peptídeos, é que eles não geram uma infecção lítica em *Escherichia coli* sendo sua infecção iniciada pelo acoplamento da p3 do fago ao f *pilus* de uma *E. coli* do gênero masculino (HEMMINGA, 2010). Somente o DNA de fita simples e circular do fago penetra na bactéria onde é convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacteriano

em uma forma replicativa de fita dupla. Esta forma replicativa sofre constantes replicações do DNA circular para gerar DNA de fita simples e ainda servir como molde para expressão das proteínas de fago. A progênie do fago é montada por empacotamento do DNA de fita simples em capsídeos protéicos e é expulsa da bactéria através da membrana para o meio extracelular (AZZAZY E HIGHSMITH, 2002).

2.6.1 *Phage display* de peptídeos

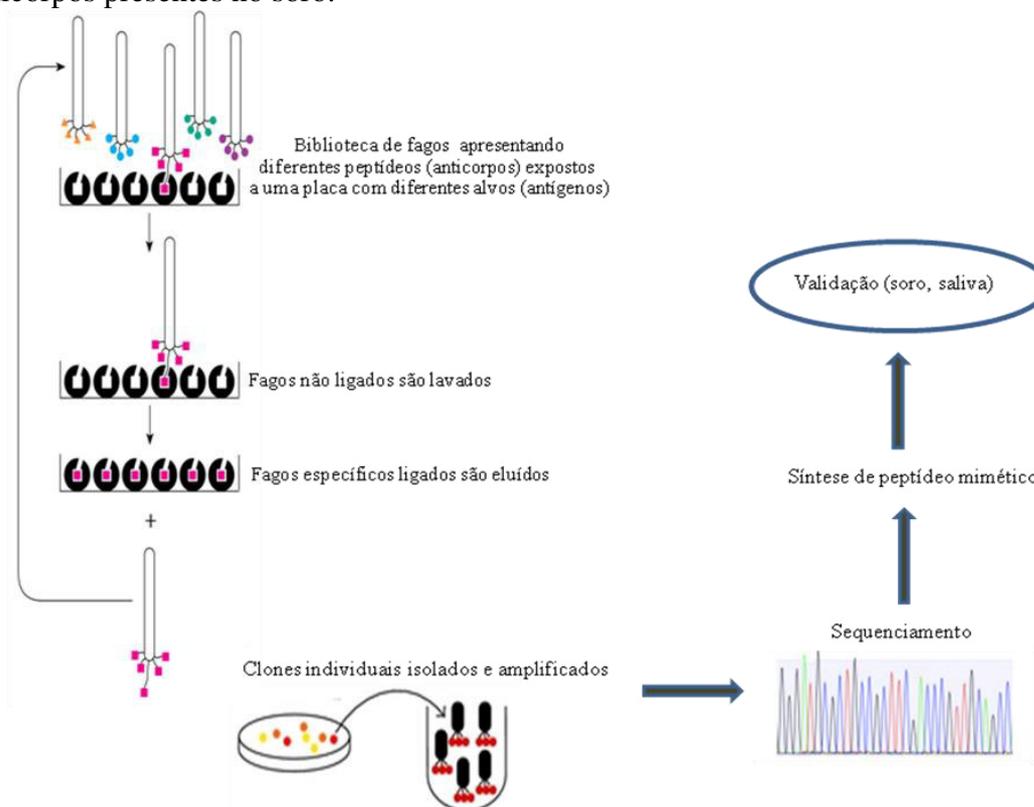
As bibliotecas de *Phage display* de peptídeos consistem na fusão de um DNA exógeno com o DNA viral em que as sequências de aminoácidos são expressas no fago (BARBAS, 2001). As bibliotecas randômicas são geradas pela utilização de oligonucleotídeos degenerados, podendo ter sete ou doze aminoácidos, em estruturas lineares ou conformacionais (SZARDENINGS, 2003).

Os peptídeos expressos no fago possibilitam a seleção de sequências baseadas em uma afinidade de ligação a uma molécula alvo por um processo de seleção por afinidade, enquanto os fagos que interagem fracamente com o alvo e os fagos não aderentes são lavados, aqueles que expõem moléculas com elevada afinidade pelo mesmo alvo são recuperados por eluição, esse processo de seleção é denominado *biopanning* (PARMLEY E SMITH, 1988; BARBAS et al., 2001).

O *biopanning* seleção biológica (ciclos de ligação, eluição e amplificação) enriquece o conjunto de fagos com sequências específicas contra o alvo, geralmente este processo é feito artificialmente, no qual a molécula alvo é imobilizada em um suporte sólido (placas de ELISA, membranas ou *beads*) (WU, 2011). (Figura 3).

Após três ou quatro repetições deste processo, clones individuais são submetidos a ensaios imunológicos e suas sequências de DNA obtidas por sequenciamento (BARBAS et al., 2001).

Figura 3: Representação esquemática do *biopanning* de peptídeos utilizando como alvo anticorpos presentes no soro.



Fonte: Adaptação da imagem disponível em: <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/applications-of-the-phd-phage-display-peptide-libraries?device=pdf>. Acessado em 10. 05.2016.

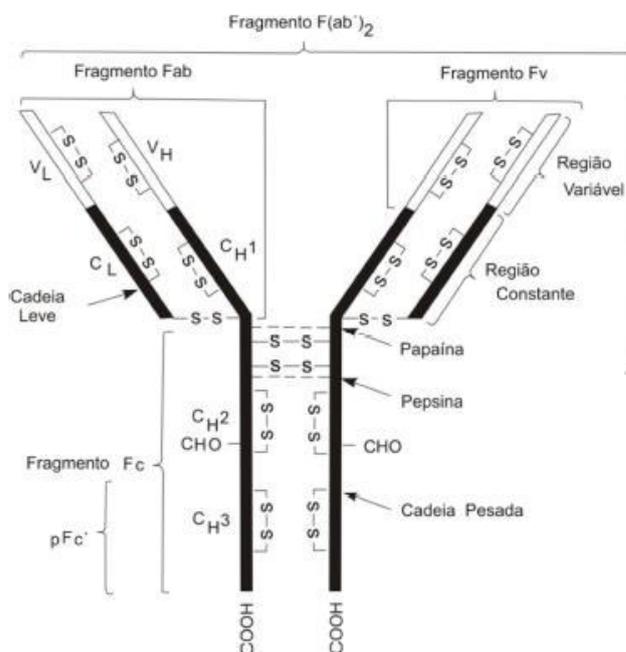
O sucesso desta técnica está na complexidade da biblioteca original juntamente com a capacidade e afinidade na seleção. Quanto maior a diversidade da biblioteca, mais numerosas serão as sequências capazes de se ligar a uma molécula alvo (ZANCONATO et al., 2011). Essa afinidade de seleção otimiza o passo de purificação gerando uma grande redução nos custos de produção (LEVISSON et al., 2014). Peptídeos selecionados contra um alvo específico que tem sequência similar ao peptídeo ligante natural são denominados miméticos (SHARMA et al., 2006).

2.6.2 *Phage display* de anticorpos

A tecnologia de *Phage display* pode ser usada na geração de anticorpos monoclonais para imunoterapia, no isolamento de anticorpos a partir de pacientes exposto a um determinado patógeno e no mapeamento de proteínas nativas (AZZAY E HICHSMITH, 2002).

Essa tecnologia não permite construir moléculas completas do anticorpo, mas fragmentos de dois tipos: fragmento de ligação com o antígeno (Fab) e fragmentos variáveis em cadeia única (scFv). O fragmentos Fab possuem segmentos VH-CH e VL-CL, unidos por pontes dissulfeto, o fragmento menor Fv (fragmento variável) é composto apenas pelas regiões VL e VH, a versão recombinante desse fragmento é conhecida como scFv (BARBAS et al., 2001) (Figura 4).

Figura 4: Representação das quatro cadeias estruturais de IgG.



Fonte: BARBAS et al., 2001.

Os fragmentos de anticorpos expressos na superfície de fagos possibilitam a seleção de sequências baseadas em uma afinidade de ligação a uma molécula alvo (antígeno) por seleção *in vitro*. Em ciclos de seleção, as moléculas de anticorpos são incubadas com a molécula alvo, os fagos contendo os anticorpos com afinidade pelo alvo são capturados e permanecem ligados e eluídos, os fagos não específicos são eliminados por sucessivas lavagens (*biopanning*) visando obter anticorpos mais específicos. Após esta seleção, Os clones resultantes do processo de *biopanning* são seqüenciados (BARBAS et al., 2001).

Atualmente, a maioria das bibliotecas é construída no formato scFv, mas esses fragmentos tendem a formar dímeros, já o fragmento Fab é monomérico e permite uma

rápida seleção entre um grande número de clones, são mais estáveis e propícios de reterem sua estrutura natural e capacidade de reconhecimento e afinidade ao seu alvo quando comparado em bibliotecas multiméricas de scFv (ZHANG et al., 2006; CHAN et al., 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Dois milhões de novos casos de leishmaniose ocorrem anualmente nas áreas tropicais e subtropicais do globo e, no Brasil, o maior número de casos de leishmaniose visceral e tegumentar está na região nordeste. O Maranhão, estado situado na fronteira entre as regiões norte, nordeste e centro-oeste, apresenta uma alta prevalência de todos os tipos de leishmanioses.

Apesar do progresso no diagnóstico e no tratamento, as leishmanioses continuam sendo um problema de saúde pública, particularmente nos países em desenvolvimento. O impacto das leishmanioses na saúde humana foi grosseiramente subestimado por muitos anos, sendo esta doença hoje classificada como uma das principais doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde.

Dessa forma é importante que essa doença tenha um diagnóstico precoce para diminuir a incidência, assim é fundamental o desenvolvimento de novas plataformas que incluam o mapeamento de antígenos com potencial imunodiagnóstico.

Nesse contexto, destaca-se a padronização de testes para validar peptídeos recombinantes e anticorpos importantes que possam ser utilizados em diagnósticos sorológicos e em construção de kits teste rápidos, pois tais moléculas possuem o mesmo comportamento biológico da molécula nativa apresentando assim, alta sensibilidade e especificidade e grande vantagem na facilidade de obtenção da quantidade necessária para o uso em grande escala.

Com a padronização de imunoenaios de ELISA, tais moléculas podem ser aplicadas no SUS (Sistema Único de Saúde) em um protocolo de aproximadamente 4 horas para o resultado final, com custo de execução e ampliação reduzidos, de fácil utilização sem necessidade de infra-estrutura laboratorial avançada, pois não necessitaria cultivar parasitas para a obtenção de extrato proteico utilizados no atual diagnóstico e consequente eficácia do tratamento, diminuindo a transmissão e o número de novas infecções.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Testar peptídeos miméticos sintéticos obtidos pela técnica de *Phage Display* para fim diagnóstico e vacinal de pacientes com leishmaniose.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Descrever o perfil de pacientes com LV e LT atendidos no município de São Luís - MA quanto às seguintes variáveis: demográfica (idade, sexo, cor da pele), socioeconômica (local de moradia, renda familiar, procedência da água, destino do lixo e dos dejetos) e procedência (zona urbana ou rural);

4.2.2 Avaliar a reatividade dos peptídeos sintéticos LC1 e LC2 (específicos para leishmaniose visceral) em amostras de soro e de saliva de pacientes com leishmaniose visceral bem como com coinfeção LV-HIV;

4.2.3 Avaliar a reatividade do peptídeo sintético LT em soro de pacientes com leishmaniose tegumentar;

4.2.4 Avaliar se os peptídeos sintéticos LC1 e LC2 específicos para leishmaniose visceral apresentam reação cruzada em soro de pacientes com Doença de Chagas, Malária e Hanseníase Tuberculoide;

4.2.5 Avaliar se o peptídeo sintético LT específico para leishmaniose tegumentar apresenta reação cruzada em soro de pacientes com Hanseníase Virchowiana;

4.2.6 Avaliar o efeito dos peptídeos miméticos sintéticos LC1, LC2 e LT em teste de invasão e de multiplicação em macrófagos da linhagem C57BL/6 desafiados com *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/72/LD) e *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), respectivamente;

4.2.7 Avaliar o peptídeo 10B, selecionado por *Phage display* contra anticorpos policlonais de soro de pacientes, como potencializador da resposta imune em camundongos desafiados por *L. amazonensis*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA

5.1.1 Critérios para seleção dos pacientes

O estudo foi realizado com pacientes acometidos de leishmaniose tegumentar, leishmaniose visceral, co-infectados com LV-HIV ou HIV positivos. Todos os pacientes foram atendidos no Hospital Presidente Vargas, São Luís - MA, no período de 2012 a 2015. Os pacientes que aceitaram participar desta pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (protocolo nº 23115-014881/2010-20).

Foram incluídos como sujeitos da pesquisa, os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão, quais sejam: diagnóstico laboratorial (parasitológico ou Elisa) de LV, LT, LV-HIV ou HIV positivo. Os pacientes responderam a um formulário contendo questões como: sexo, faixa etária, idade, cor da pele, alguns aspectos socioeconômicos (local de moradia, renda familiar, procedência da água, destino do lixo e dos dejetos) e procedência (zona urbana ou rural). Foram coletadas amostras biológicas de saliva e sangue para obtenção de soro.

5.1.2 Amostras

a) Amostras de soro

As amostras de soro foram obtidas a partir de 5 mL de sangue venoso periférico coletado por punção da veia braquial através de sistema Vacutainer® (Becton Dickinson Biosciences) em tubo de gel separador de sangue/soro, sendo centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos para a obtenção do soro.

Do total de 223 indivíduos amostrados, 123 eram pacientes com leishmaniose visceral, 45 com leishmaniose tegumentar, 55 pacientes com coinfeção LV-HIV e 40 pacientes HIV positivos. A fim de compor o grupo controle foram utilizados soros de 75 recém-nascidos. Para os testes de reação cruzada com os peptídeos sintéticos foram utilizadas amostras de pacientes com Doença de Chagas (n = 60), com Malária (n = 65), Hanseníase Tuberculóide (n = 20) e Hanseníase Virchowiana (n = 20), todos gentilmente cedidos pela soroteca do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Foram realizados também testes diagnósticos utilizando os peptídeos miméticos LC1 e LC2 em soro de 15 indivíduos assintomáticos (sem manifestações clínicas da

doença, com intradermorreação de Montenegro positiva (IDRM) e teste sorológico por ELISA positivo); 13 indivíduos curados (com doença confirmada pela positividade do exame parasitológico do aspirado de medula óssea (mielograma), e considerados clinicamente curado após 12 meses do fim do tratamento) e 15 indivíduos sadios (sem manifestações clínicas da doença e com Intradermorreação de Montenegro negativa (IDRM) e pesquisa de anticorpos anti-*leishmania* negativa por ELISA).

b) Amostras de saliva

A saliva foi coletada por meio do sistema Salivette® (Sarstedt) seguindo as orientações do fabricante, e posteriormente centrifugada por 2 minutos a 1000xg. Foram coletadas amostras de 65 pacientes com leishmaniose visceral e de 40 pacientes com leishmaniose tegumentar. O grupo controle foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia e foi composto de 35 indivíduos saudáveis de área endêmica com diagnóstico negativo para leishmanioses.

5.1.3 Seleção de peptídeos miméticos (ALMEIDA, 2011)

Para a seleção dos peptídeos recombinantes (peptídeos expressos na proteína pIII de fagos filamentosos) foi utilizada uma biblioteca comercial de 12 aminoácidos (Ph.D. – 12TM mer - New England Biolabs). Os procedimentos experimentais foram baseados no protocolo disponibilizado pelo fabricante, com adequações no intuito de aumentar a especificidade para os alvos analisados.

Resumidamente, IgG total foi purificado a partir de um *pool* de soros de 10 pacientes (Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil), utilizando Proteína G resina de agarose.

Para a seleção dos peptídeos recombinantes para Leishmaniose visceral, dois tipos de eluição foram utilizados: uma eluição específica com antígeno recombinante - rK39 e uma segunda eluição com o antígeno total de *L. infantum chagasi*. Para a seleção dos peptídeos de Leishmaniose tegumentar os fagos foram eluídos com proteína total de *L. amazonensis*.

Após as eluições, os fagos obtidos foram submetidos a imunoenaios de ELISA e os mais frequentes foram sequenciados. Dos fagos sequenciados, três (2 para LV e 1

para LT) foram selecionados para síntese química atendendo os critérios de maior reatividade.

5.1.4 Síntese de peptídeos

Peptídeos miméticos selecionados por *Phage display* tendo como alvos IgG de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar foram produzidos por ALMEIDA (2011). Os peptídeos miméticos foram sintetizados quimicamente pela empresa GeneScript (Piscataway, NJ, EUA).

Os peptídeos LC1 e LC2, específicos para *Leishmania infantum chagasi*, possuem, respectivamente, as sequências: ATPRSIHDSSETL e YPTKASGNDLRG, as quais contêm 12 aminoácidos e uma amidação C-Terminal. O peptídeo LT possui a sequência SSALSAATTAHR com 12 aminoácidos e uma amidação C-Terminal e é específico para *Leishmania amazonensis*. Os peptídeos foram diluídos em água ultrapura na concentração de 9,5 mg/mL (LC1 e LC2) e 7,6 mg/mL (LT) aliquotados e mantidos a -20°C para uso posterior.

O peptídeo mimético denominado irrelevante (ACGFPSSSVCGG) utilizado neste trabalho refere-se a um peptídeo também selecionado por meio da tecnologia de *Phage display*, tendo como alvo anticorpos policlonais de brucelose. A síntese e a diluição (10,1 mg/mL) foram feitas de maneira idêntica às mencionadas para os peptídeos testes.

5.1.5 Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos em soro dos pacientes

Placas de ELISA (Nunc - Maxisorb) foram sensibilizadas com os peptídeos sintéticos (1 µg/poço) e tampão carbonato-bicarbonato (pH= 9,6) a 4°C, *overnight*. Após essa etapa, as placas foram lavadas uma vez com PBS Tween 20 0,05% e bloqueadas com PBS-BSA 5% (Sigma-Aldrich) a 37°C. Depois de 1 hora, as placas foram novamente lavadas uma vez, para a adição dos soros (1:100) dos pacientes com leishmaniose e incubadas a 37°C.

Após 1 hora, as placas foram lavadas por três vezes, para adicionar o anticorpo secundário, anti-IgG marcado com peroxidase (Roche AppliedScience) em uma concentração de 1:5000, que foram incubadas por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas três vezes e, posteriormente, as reações reveladas com OPD (o-fenilenodiamina) (Sigma-Aldrich) e interrompidas pela adição de 50 µL de solução de H₂SO₄ 2N. Os

resultados foram obtidos com base na leitura da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro com filtro de 492 nm (Thermo Plate).

5.1.6 Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos em saliva de pacientes

Placas de ELISA (Nunc- Maxisorb) foram sensibilizadas com os peptídeos sintéticos (10 µg/poço) e tampão carbonato-bicarbonato (pH = 9,6) a 4°C, *overnight*. Após essa etapa, as placas foram lavadas uma vez com PBS Tween 200 0,05% e bloqueadas com PBS-BSA 1% (Sigma-Aldrich) a 37°C. Depois de 1 hora, as placas foram novamente lavadas duas vezes, para a adição das salivas (1:5) dos pacientes com leishmaniose e incubadas a 37°C.

Após 1 hora, as placas foram lavadas por três vezes para adicionar o anticorpo secundário anti-IgA marcado com peroxidase (Roche AppliedScience) em uma concentração de 1:1000, as quais foram incubadas por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas seis vezes, posteriormente as reações reveladas com OPD - o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich) e interrompidas pela adição de 50 µL de solução de H₂SO₄ 2N. Os resultados foram obtidos com base na leitura da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro com filtro de 492 nm (Thermo Plate).

5.1.7 Análise estatística

Os dados dos pacientes foram tabulados no sistema de processamento de planilhas Microsoft Excel[®] versão 2007 (Microsoft Co., Redmond, WA, EUA). O software GraphPadPrism 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para realização dos testes estatísticos. As variáveis qualitativas são apresentadas por meio de frequências e porcentagens.

As comparações entre os grupos de pacientes e controles foram feitas por análise de variância (ANOVA), foi construída uma curva ROC (*receiver operating characteristic*) e o valor *cut-off* para determinar o melhor ponto de sensibilidade e especificidade, na detecção da leishmaniose. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Bonferroni (GraphPadPrism 5.0) considerando-as significativas quando $p < 0,05$.

5.2 ABORDAGEM VACINAL

5.2.1 Ensaios *in vitro*

a) Parasitos

Os parasitos utilizados neste estudo foram *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8), isolados de camundongos infectados e *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/72/LD) isolados de hamsters, mantidos no Laboratório de Tripanossomatídeos da Universidade Federal de Uberlândia – MG (LATRI – UFU). As formas promastigotas foram cultivadas em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion - Himedia*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina (Sigma-Aldrich), 1% de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 1% gentamicina (Sigma-Aldrich). Os parasitos foram acondicionados em garrafas acrílicas estéreis e descartáveis, e mantidos a uma temperatura de 23°C em estufa B.O.D e 32°C para as formas amastigotas.

Os parasitos utilizados nos experimentos eram provenientes de cultura no final da fase estacionária de desenvolvimento na forma promastigota metacíclica.

b) Cultivo de macrófagos

Macrófagos de linhagens murinos C57BL/6 foram cedidos pelo Laboratório de Tripanossomatídeos da Universidade Federal de Uberlândia - MG (LATRI - UFU). As células foram mantidas em garrafas pequenas de cultura acrílicas estéreis e descartáveis, meio de cultura DMEM Gibco® (*Dulbecco's Modified Eagle Medium - Thermo Fisher Scientific*) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% de penicilina (Sigma-Aldrich), 1% de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 1% gentamicina (Sigma-Aldrich) mantidas em estufa de CO₂ a 5% com temperatura de 37°C.

c) Teste de viabilidade celular (Alamar Blue®)

A viabilidade celular foi determinada pela resazurina 10% (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) solúvel em PBS, corante azul extremamente estável, não tóxico, não lesivo, não promove a desagregação celular, no caso de células aderentes. Considerado o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (O'BRIEN et al., 2000; FUKUSHIMA et al., 2003; HAMID et al., 2004; JONES E GRAINGER, 2009; STODDART et al., 2010; RAMPERSAD et al., 2012; RISS et al., 2015).

A resazurina quando adicionada à cultura celular entra no citosol e pode sofrer redução enzimática na mitocôndria, conduzida pelo NADPH, devido à atividade de enzimas tais como: flavina mononucleótido desidrogenase, flavina adenina desidrogenase, nicotinamida adenina desidrogenase e citocromos (O'BRIEN et al., 2000). Com a extensão da redução enzimática, resazurina (cor azul) é transformada em resorufina (cor rosa púrpura), que é excretada para fora da célula sendo acompanhada com a mudança de cor de azul para rosa púrpura, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria (AL-NASIRY et al., 2007; BORRA et al., 2009, STODDART et al., 2010).

Utilizou-se células de macrófagos C57BL/6 com aproximadamente 80% de confluência foram coletadas utilizando tripsina (250 mg/mL) e em meio DMEM completo. Em seguida, as células foram distribuídas em uma placa de cultura celular de 96 poços (1 x 10⁵ células/poço) e mantidas *overnight* nas mesmas condições de cultura acima mencionadas a fim de permitir a aderência celular.

Para o tratamento das células com as concentrações dos peptídeos foram realizados testes pilotos, onde a concentração inicial do peptídeo sintético foi de 100 µM (ALMEIDA, 2011). Após os testes preliminares, os macrófagos foram então tratados com os peptídeos sintéticos por 2 h nas concentrações de 0,6 µM; 1,25 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM e 12 µM. Como controle positivo foi utilizado H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) 10 mM, como controle negativo foram utilizadas células cultivadas apenas em meio de cultura e controle de veículo água ultrapura. Em seguida, foi acrescentando às células 50 µL de Alamar Blue[®] e foram incubadas por 24 horas no escuro em estufa de CO₂ a 5% com temperatura de 37°C.

A taxa de redução com base na mudança de cor foi quantificada em leitora de microplacas (Thermo Plate) na absorvância de 594 nm. As concentrações e controles foram analisados em triplicata. Para cálculo da viabilidade celular foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = (\text{OD células tratadas} / \text{OD controle negativo}) \times 100.$$

d) Teste de invasão com parasitos *in vitro*

Macrófagos C57BL/6 com aproximadamente 80% de confluência foram coletadas utilizando tripsina (250 mg/mL) e meio de cultura celular DMEM. Em seguida, as células foram distribuídas em uma placa de cultura celular de 24 poços (1 x

10⁵ células/poço) e mantidas nas mesmas condições de cultura mencionadas anteriormente, a fim de permitir a aderência celular.

Os macrófagos foram então tratados com os peptídeos sintéticos por 2 h nas concentrações de 0,6 µM; 1,25 µM ; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM. Em seguida, procedeu-se o ensaio de invasão na razão parasita 5:1 por 4h à temperatura ambiente com as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania amazonensis*.

Após o período de infecção, o sobrenadante foi retirado para dosagem de citocinas, as lamínulas lavadas com PBS 1x, fixadas com Bouin (Sigma-Aldrich) por 15 minutos, lavadas com PBS 1x por várias vezes até que a coloração amarelada desaparecesse. Em seguida, as lamínulas foram coradas com Giemsa 20% (LaborClin), descoradas com acetona (Vetec) e xilol (dimetilbenceno) (Hycel) nas proporções 9:1, 7:3, 3:7, secas a temperatura ambiente.

Após 24 horas, as lamínulas foram coladas com Permout (Fisher Scientific) em lâminas de vidro previamente identificadas para análises em microscópio óptico com objetiva 100X. Foram analisadas 100 células infectadas e quantificados os parasitos para determinar o índice de infecção (porcentagem de macrófagos infectados em 100 células analisadas).

e) **Teste de multiplicação com parasitos**

Macrófagos C57BL/6 com aproximadamente 80% de confluência foram coletados utilizando tripsina (250 mg/mL) e meio DMEM. Em seguida, as células foram distribuídas uma placa de cultura celular de 24 poços com lamínula circular de acordo com o tempo usado para multiplicação dos parasitas, então 24 h (6 x 10⁴ células), 48 h (4 x 10⁴ células), 72 h (4 x 10⁴ células) e 96 h (2 x 10⁴ células) e mantidas nas mesmas condições de cultura mencionadas anteriormente, a fim de permitir a aderência celular.

Posteriormente, procedeu-se o ensaio de multiplicação. As formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis* foram plaqueadas na razão parasita 1:1 e, após 4 horas, foram adicionados os peptídeos LC1, LC2, LT e IRREL (irrelevante) nas seguintes concentrações: 0,6 µM; 1,25 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM por 24h, 48 h, 72 h e 96 h e mantidas nas mesmas condições de cultura.

Após o período de cada tratamento, as lamínulas foram lavadas com PBS 1x, fixadas com Bouin (Sigma-Aldrich) por 15 minutos, lavadas com PBS 1x por várias

vezes até que a coloração amarelada desaparecesse. Em seguida, as lamínulas coradas com Giemsa 20% (LaborClin), foram descoradas com acetona e xilol nas proporções 9:1, 7:3, 3:7, e secas à temperatura ambiente.

Após 24 horas, as lamínulas foram coladas com Permount (Fisher Scientific) em lâminas de vidro previamente identificadas e analisadas em microscópio óptico com objetiva 100X. Foram analisadas 100 células infectadas e quantificados os parasitos para determinar o índice de infecção (porcentagem de macrófagos infectados em 100 células analisadas).

f) Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicatas, as diferenças entre as médias foram analisadas em two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni no *software* GraphPad Prism versão 5.01 para Windows, considerando-as significativas quando $p < 0,05$.

5.2.2 Ensaio *in vivo* – Potencial protetor do peptídeo mimético 10B contra *L. amazonensis*

a) Animais

Camundongos BALB/c fêmeas (8 semanas de idade) foram obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, os quais foram mantidos sob condições controladas de temperatura, umidade e ciclo de luz.

b) Parasitas

Leishmania amazonensis (IFLA/BR/67/PH-8) foi cultivada a 24°C em meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% soro bovino fetal inativado (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamina, 200 U/mL penicilina, e 100 µg/mL estreptomicina, com pH 7,4. O extrato antigênico solúvel de *L. amazonensis* foi preparado a partir de culturas de promastigotas na fase estacionária (5 a 7 dias de cultura) tal como descrito por Chávez-Fumagalli et al. (2010).

c) Imunização e infecção

Os camundongos foram divididos em cinco grupos (n = 8 por grupo), a saber: 1) animais vacinados subcutaneamente na pata esquerda traseira com 1×10^7 PFU/mL do isolado do fago associado a 25 μ g de saponina (Quillaja saponaria bark saponin; Sigma); 2) animais tratados somente com saponina; e 3) animais tratados somente com salina. Foram administradas três doses em intervalos de duas semanas. Quatro semanas após a última inoculação, quatro animais de cada grupo foram eutanasiados para análise da resposta imune. Nesse mesmo momento, os animais restantes (n = 4 por grupo) foram infectados na pata traseira direita com 10^6 de promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária.

O curso da doença foi monitorado semanalmente medindo-se a espessura da pata com um paquímetro eletrônico (799-6/150 model, Starrett®, Brasil), e expressado como o aumento da lesão da pata direita infectada comparada com a pata esquerda não infectada. O desenvolvimento das lesões nas patas foram avaliadas por 11 semanas.

d) Estimativa da carga parasitária

Os camundongos (n = 4 por grupo) foram eutanasiados na 11ª semana após a infecção para coleta do fígado, baço, medula óssea, linfonodo poplíteo e as patas infectadas. A carga parasitária foi determinada pelo ensaio de diluição limitante, como descrito por Vieira et al. (1996). Resumidamente, os órgãos foram pesados e homogeneizados utilizando-se um macerador de tecidos de vidro e tampão fosfato salino estéril (PBS). O material foi centrifugado a 150 xg e descartado sobrenadante (debris), e as células foram concentradas a 2000 xg. O sedimento celular foi ressuspendido em 1mL de meio Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal. Um volume de 220 μ L do material foi colocado em placas de microtitulação com 96 poços (Nunc, Nunclon®, Roskilde, Denmark) e diluídas de forma seriada em meio Schneider suplementado (10^0 a 10^{-20}). Cada amostra foi plaqueada em triplicata e a análise foi feita 10 dias após o início da cultura (24°C). Os resultados foram expressos em logaritmo de acordo com a diluição correspondente ao último poço positivo para presença do parasita, ajustado por micrograma de tecido.

e) Análise de Citocinas

Cultura de esplenócitos e análise de citocinas foram realizadas antes do desafio e na 10^a semana após a infecção, conforme Chávez-Fumagalli et al. (2010). Resumidamente, preparações de célula única de baço foram plaqueadas em duplicata em placas de 24 poços (Nunc) a 5×10^6 células/mL. As células foram incubadas em meio de cultura DMEM (controle) ou estimuladas separadamente com SLA (25 µg/mL), a 37°C em 5% CO₂ por 48 h. Foram avaliados os níveis de IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF no sobrenadante por meio do ensaio ELISA usando anticorpos monoclonais (captura e detecção) de kits comerciais, incluindo BD OptEIA™ Set Mouse IFN-γ (AN-18), IL-12 e GM-CSF cat. 2661KI, 2620KI e 2760KI, respectivamente (PharMingen, San Diego, CA, USA) assim como IL-4 Murine e IL-10 ELISA development kits, cat. 900-K49 e 900-K53, respectivamente (PeproTech®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), seguindo-se as instruções dos fabricantes.

f) Análise de proteínas por Western Blot

Extratos celulares totais foram obtidos do homogeneizado do tecido da pata infectada usando-se tampão de lise (1% Triton X-100, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 25mM NaF, 2.5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, e 1 mM orthovanadato de sódio). Os lisados foram centrifugados a $13.000 \times g$ por 10 min a 4°C, e quantificados usando-se o ensaio Bradford obtido da Bio-Rad (Hercules, CA). Os extratos (40 µg) foram aplicados em 10% SDS-PAGE e transferido para membrana de nitrocelulose, como descrito por Sousa et al (2010).

As membranas foram bloqueadas durante a noite a 4°C com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween-20, lavado três vezes com PBS contendo 0,1% de Tween-20, e incubado com anticorpos monoclonais anti P-ERK1/2, anti-JNK, anti-P65/RelA (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) na diluição de 1:1.000 em tampão fosfato salino contendo 5% (w/v) BSA e 0,1% de Tween-20. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:3.000). Bandas imunorreativas foram visualizadas por meio de um sistema de detecção de quimioluminescência, como descrito (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Os níveis de P-ERK1/2, P-JNK e P-p65 foram quantificados por análise densitométrica (LabImage, Leipzig, Alemanha) e normalizados o nível de β -actina na mesma amostra. Mudanças no nível de proteína foram estimadas com base nos valores controles e os resultados foram expressos como a razão entre P-ERK1/2, P-JNK e P-p65 para β -actina, medidas em unidades arbitrárias.

g) Análise estatística

A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA utilizando pós-teste de Bonferroni (*software* GraphPad Prism versão 5.01 para Windows) para comparações entre os grupos experimentais. Para a análise de densitometria foi utilizado o *software* LabImage (Leipzig, Alemanha). Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5.2.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS LIGANTES

a) Crescimento e purificação em larga escala de anticorpos recombinantes

Para a obtenção dos anticorpos recombinantes foi realizado dois *biopannings* individuais de anticorpos ligantes na superfície dos promastigotos de *L. infantum chagasi* e *L. amazonensis*, seguida de incubação com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Os sobrenadantes contendo as moléculas de Fab na forma solúvel foram submetidos a imunoenaios de ELISA. Os anticorpos recombinantes mais reativos foram 10E e 12C contra *L. infantum chagasi* e 2F, 7H contra *L. amazonensis* (ALMEIDA, 2011).

Os anticorpos recombinantes obtidos foram expressos em larga escala seguindo o seguinte procedimento: inoculados individualmente em 1 mL de meio SB contendo 100 mg/mL de carbenicilina e 2% de glicose 2M (v/v) em erlenmeyer e incubados *overnight* sob a agitação a 37°C. No dia seguinte, 50 μ L da cultura foram transferidos para um novo frasco erlenmeyer contendo 1 mL de meio SB suplementado com 100 mg/mL de carbenicilina e 2% de glicose 2M (v/v) mantido sob agitação a 37°C por 4 horas. A cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos a 25 °C e o sedimento ressuspenso em 1 L de meio SB suplementado com 100 mg/mL de carbenicilina, 2% de glicose 2M (v/v) e 2 mM de IPTG (isopropil-b-D-galactosídeo) (Promega) e mantido sob agitação a 30°C, *overnight*. A cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos

a 4°C e o sobrenadante foi purificado em coluna de afinidade (Nisepharose His Trap HP – GeHealthcare) em HPLC.

b) Imunoprecipitação

Beads magnéticos foram ressuspensos e transferidos para um tubo de 1,5 mL com auxílio de um aparato magnético, o sobrenadante foi descartado e os beads foram lavados por duas vezes com 1 mL de tampão de ligação. Após a lavagem, os beads foram ressuspensos em tampão de ligação e foi adicionado 1 mL do anticorpo recombinante purificado (50 µg). O tubo foi agitado gentilmente e mantido a temperatura ambiente sob agitação por 1 h. O sobrenadante foi descartado e os beads lavados duas vezes.

Aos *beads* magnéticos foi adicionado o extrato proteico (1.000 µg) de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum chagasi*, respectivamente, para cada anticorpo recombinante, e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os beads lavados 4 vezes e, em seguida, foi adicionado 10 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e incubados por 5 minutos a 100°C. Após incubação, eles foram separados utilizando aparato magnético e o eluato transferido para dois tubos, dos quais um foi analisado por SDS-PAGE e o outro foi analisado por espectrometria de massas.

c) Eletroforese em SDS-PAGE

As amostras em tampão foram aplicadas em cada poço do gel. Foi utilizado um marcador de peso molecular (SIGMA MARKER™ Wide Molecular Weight Range) para determinar o tamanho das proteínas no gel. Foram utilizados dois tampões de corrida: ânodo (Tris-HCl 0,2M pH 8,9) e cátodo (Glicina 0,1M; Tris 0,1M; 0,1% de SDS). A corrente foi fixada em 120V e a corrida foi realizada por 2 horas. O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare).

A membrana foi bloqueada durante 1 hora com 3% de BSA em PBS, lavadas e, em seguida, três vezes em tampão de lavagem contendo PBS-Ta 0,1%. Em seguida, a membrana foi incubada durante a noite a 4°C com anticorpo recombinante purificado, lavadas três vezes e incubadas durante 1 hora com anti-His conjugado com peroxidase (GE Healthcare) diluída 1: 5.000 em PBS mais 3% BSA. A membrana foi lavada e revelada em ECL (GE Healthcare).

6. RESULTADOS

6.1 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA

6.1.1 Caracterização dos pacientes

A amostra em estudo foi composta por 263 indivíduos, sendo 123 pacientes com leishmaniose visceral, 45 com leishmaniose tegumentar, 55 pacientes com coinfeção LV-HIV e 40 pacientes HIV-positivos (Tabela 1).

Tabela 1 - Características demográficas e socioeconômicas dos grupos de pacientes atendidos no Hospital Presidente Vargas, São Luís - MA no período de 2012 a 2015.

Características	Categorias	LV (%)	LT (%)	LV-HIV (%)	HIV (%)
Sexo	Feminino	90 (73%)	25 (55,5%)	33 (60%)	27 (67,5%)
	Masculino	33 (27%)	20 (44,5%)	22 (40%)	13 (32,5%)
Idade	< 15 anos	30 (24%)	10 (22,3%)	0	0
	≥ 15 anos	93 (76%)	35 (77,7%)	55 (100%)	40 (100%)
Cor	Branca	53 (43%)	19 (42,2%)	21 (38,2%)	19 (47,5%)
	Negra	33 (27%)	9 (20%)	19 (34,5%)	4 (10%)
	Parda	37 (30%)	17 (37,8%)	15 (27,3%)	17 (42,5%)
	Analfabeto	63 (51,2%)	15 (33,3%)	21 (38,2%)	9 (22,5%)
Grau de instrução	Ensino fundamental incompleto	27 (22%)	13 (29%)	15 (27,2%)	11 (27,5%)
	Ensino fundamental completo	13 (10,6%)	9 (20%)	9 (16,4%)	7 (17,5%)
	Ensino médio incompleto	15 (12,2%)	5 (11,1%)	7 (12,7%)	8 (20%)
	Ensino médio completo	5 (4%)	3 (6,6%)	3 (5,5%)	5 (12,5%)
Local de moradia	Zona urbana	28 (22,7%)	17 (37,8%)	20 (36,4%)	25 (62,5%)
	Zona rural	95 (77,3%)	28 (62,2%)	35 (63,6%)	15 (37,5%)
Renda familiar	< 1 salário mínimo	64 (52%)	21 (46,7%)	28 (51%)	20 (50%)
	1 a 2 salários mínimos	48 (39%)	15 (33,3%)	17 (31%)	17 (42,5%)
	> 2 salários mínimos	11 (9%)	9 (20%)	10 (18%)	3 (7,5%)
Destino de dejetos humanos	Sistema de esgoto	61 (49,6%)	15 (33,2%)	17 (31%)	15 (37,5%)
	Fossa séptica	28 (22,7%)	9 (20%)	18 (32,7%)	11 (27,5%)
	Fossa negra	18 (14,7%)	11 (24,5%)	9 (16,3%)	9 (22,5%)
	Não possui	16 (13%)	10 (22,3%)	11 (20%)	5 (12,5%)
Abastecimento de água	Rede pública	20 (16,3%)	20 (44,5%)	17 (31%)	17 (42,5%)
	Poço	66 (53,7%)	16 (35,5%)	15 (27,2%)	13 (32,5%)
	Cisterna	37 (30%)	9 (20%)	23 (41,8%)	10 (25%)
	Rede pública	25 (20,3%)	23 (51%)	13 (24%)	25 (62,5%)
Destino do lixo	Incineração própria	89 (72,4%)	9 (20%)	32 (58%)	10 (25%)
	Não possui	9 (7,3%)	13 (29%)	10 (18%)	5 (12,5%)

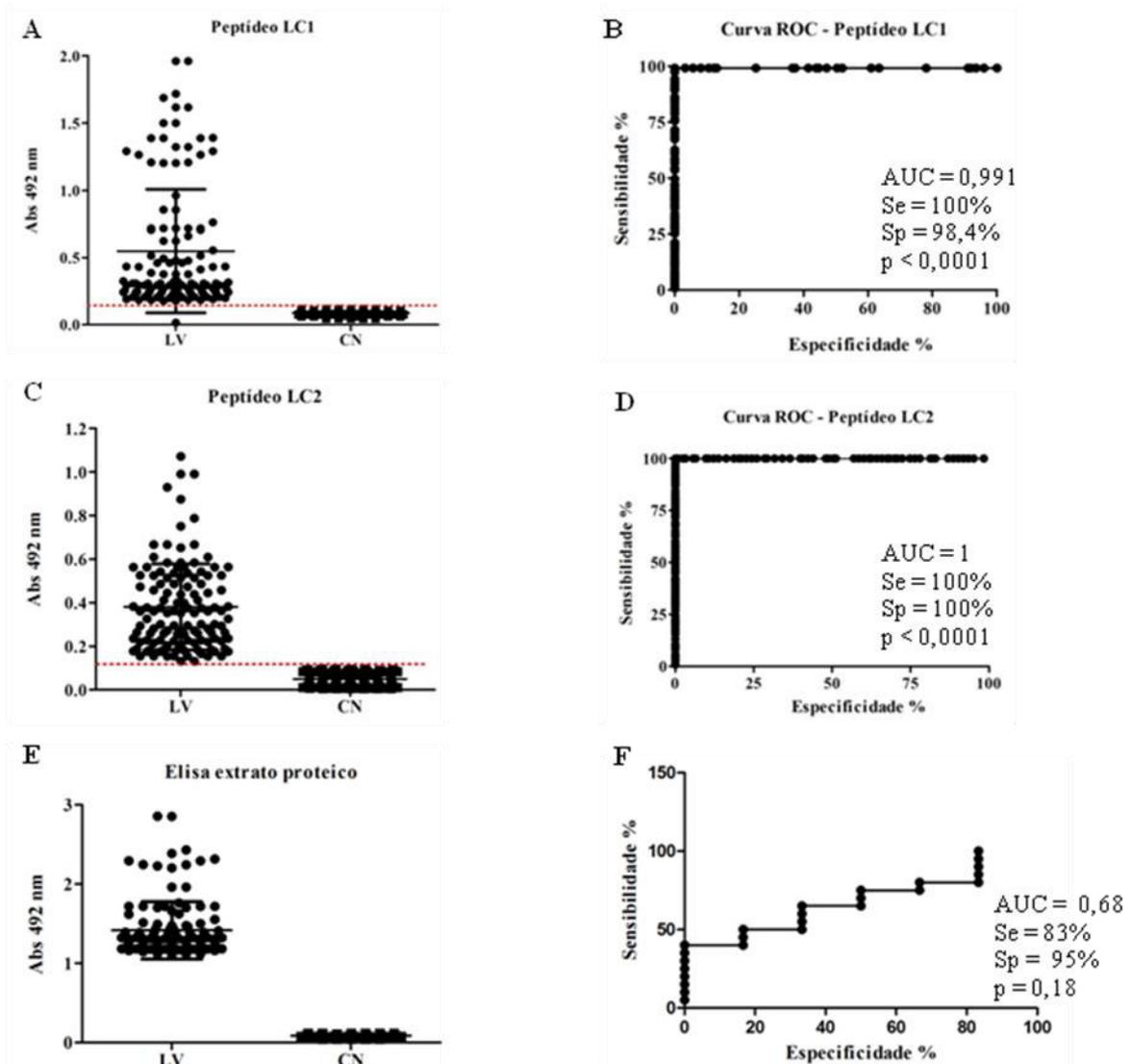
A faixa etária predominante nos grupos estudados foi maior de 15 anos, do sexo feminino, de cor branca e analfabeta. Quanto às características socioeconômicas, a maioria é procedente da zona rural, com renda familiar menor a 1 salário mínimo; possui destinação específica para os dejetos humanos; possui poços como fonte de água para abastecimento.

6.1.2 Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos em soro dos pacientes com leishmaniose

A dosagem de anticorpos revelou que os peptídeos LC1 e LC2 apresentaram uma diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando o grupo de pacientes com leishmaniose visceral foi comparado ao grupo controle, apresentando um valor de *cut-off* igual a 0,16 para o peptídeo LC1 e de 0,13 para o peptídeo LC2 (Figuras 5 A. e 5C.).

O peptídeo LC1 apresentou 98,4 de sensibilidade e 100% de especificidade, enquanto o peptídeo LC2 apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, considerando uma curva ROC com área de 0,991 para LC1 e de 1 para LC2 (Figuras 5B. e 5D.), o diagnóstico realizado utilizando o extrato proteico revelou 83% de sensibilidade e 95% de especificidade (Figura 3F.). Ao correlacionar os resultados obtidos com o extrato proteico, observa-se uma forte correlação entre a reatividade dos peptídeos miméticos com aquela obtida com o extrato proteico utilizado no diagnóstico atual, ($R^2 = 0,967$ e $y = 0,992x + 0,004$ (para LC1) e $R^2 = 0,888$ e $y = 0,979x + 0,022$ (para LC2).

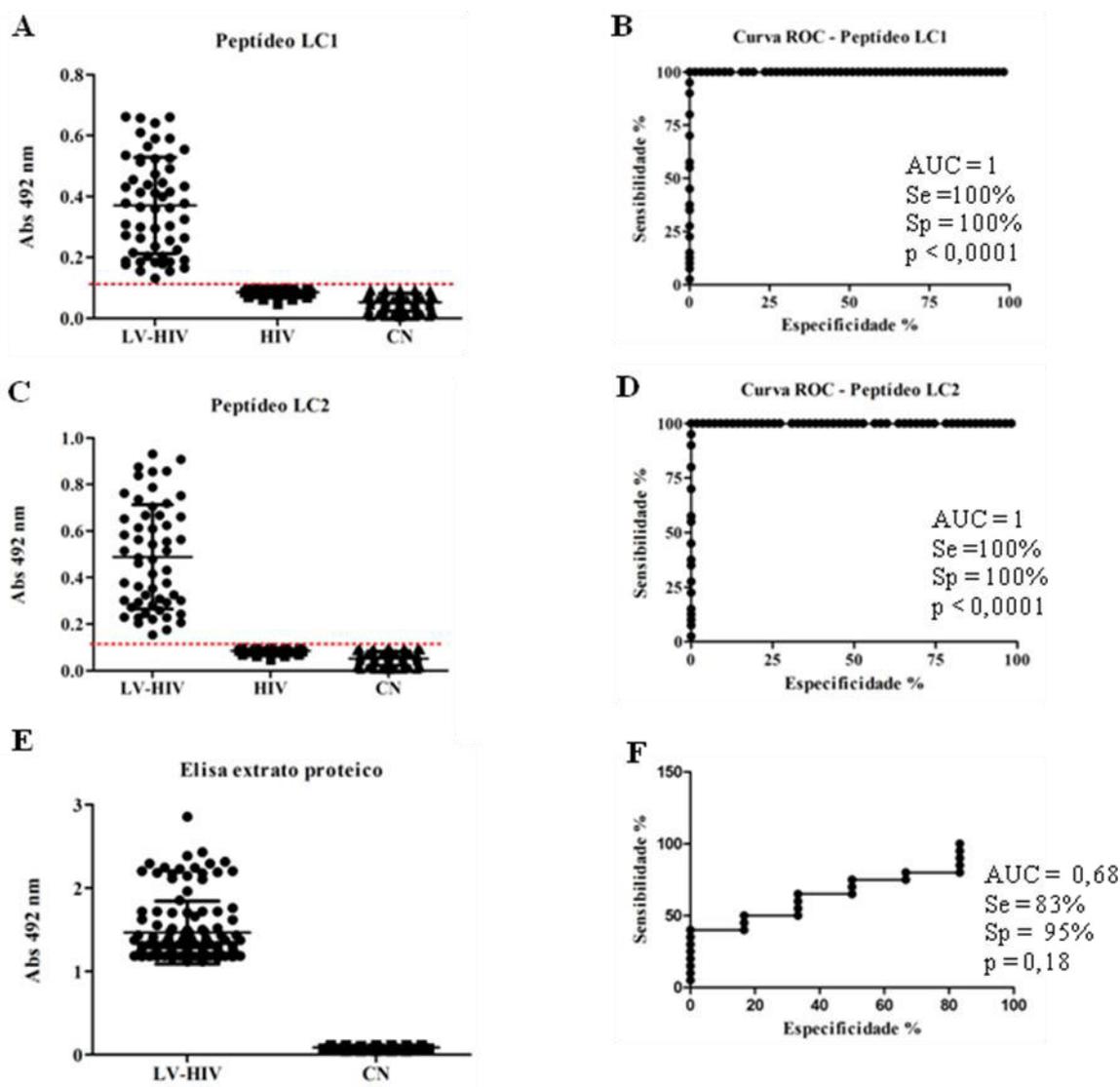
Figura 5. Detecção de anticorpos por ELISA utilizando peptídeos miméticos LC1 e LC2. **A.** Reatividade de LC1 com soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV) e recém-nascidos (CN). **B.** Curva ROC apresentando a sensibilidade e especificidade. **C.** Reatividade de LC2 com pacientes de leishmaniose visceral e recém-nascidos. **D.** Curva ROC. **E.** ELISA utilizando extrato proteico em soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV) e recém-nascidos (CN). **F.** Curva ROC apresentando a sensibilidade e especificidade.



Os peptídeos LC1 e LC2, ao serem testados com soros individuais de pacientes com coinfeção LV-HIV, apresentaram também diferença altamente significativa ($p < 0,0001$), com valor de *cut-off* igual a 0,11 (Figura 6). Os peptídeos apresentaram 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, revelando curvas ROC com áreas de 1 (Figuras 6C. e 6D.). Para o diagnóstico realizado utilizando o extrato proteico, observou-se 83% de sensibilidade e 95% de especificidade (Figura 6F.). A correlação

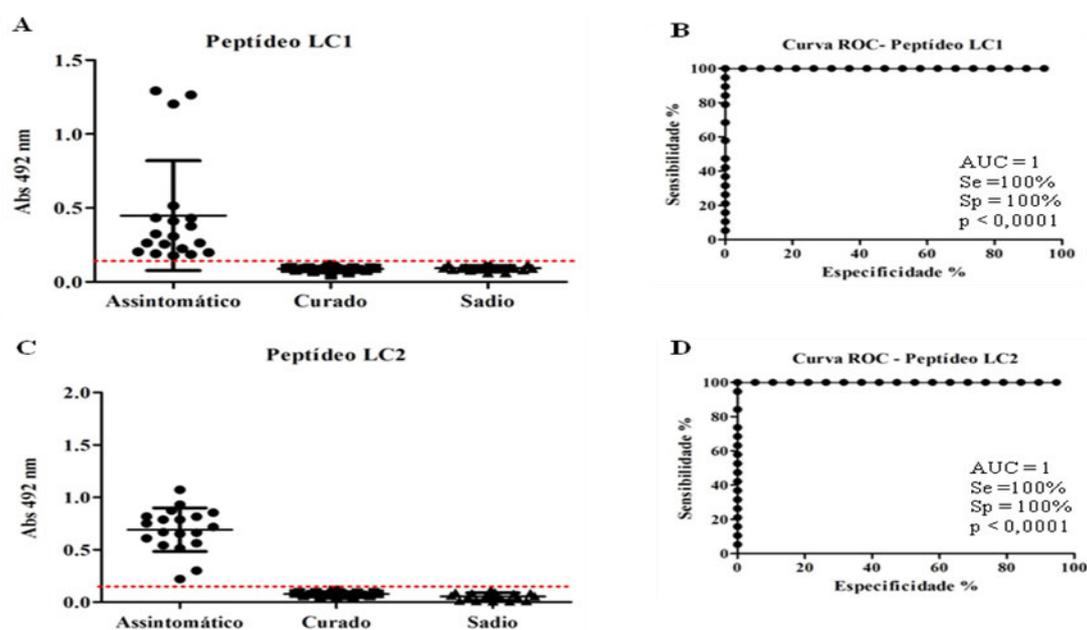
entre as reatividades obtidas com LC1 e LC2, comparadas com o extrato proteico, demonstrou uma forte correlação dos peptídeos com o diagnóstico atual, com $R^2 = 0,955$ e $y = 1,033x - 0,002$ (LC1) e $R^2 = 0,973$ e $y = 0,987x + 0,012$ (LC2).

Figura 6. **A. C.** Soros de pacientes com coinfeção LV-HIV e grupo de recém-nascidos usado como controle negativo (CN). Os soros foram testados individualmente quanto à sua capacidade para se ligar ao peptídeo sintético LC1 e LC2. A linha horizontal corresponde ao valor *cut-off* 0,11. **B.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e a especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor $p < 0,0001$ são indicados no gráfico. **E.** ELISA utilizando extrato proteico contra soro de pacientes com leishmaniose visceral (LV) e recém-nascidos (CN). **F.** Curva ROC apresentando a sensibilidade e especificidade.



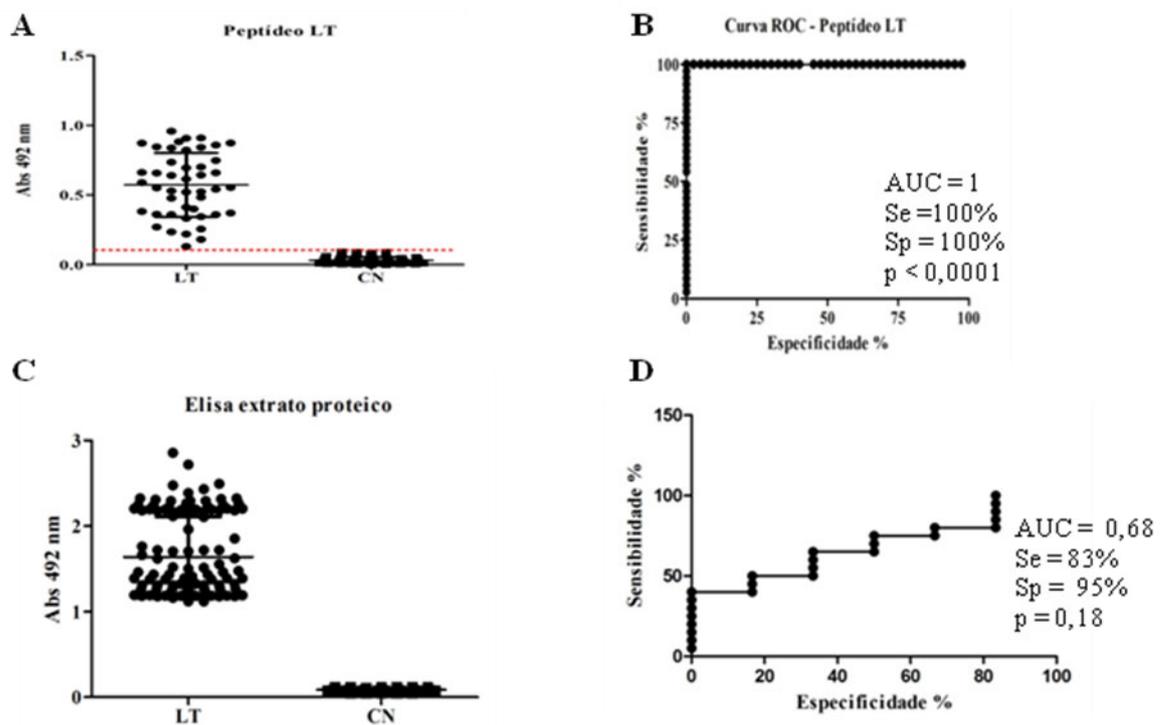
A detecção de anticorpos utilizando os peptídeos LC1 e LC2 em grupos assintomático, curado e sadio revelou uma diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando estes grupos foram comparados entre si. O valor de *cut-off* revelado foi 0,14 para o peptídeo LC1 e 0,16 para o peptídeo LC2. (Figuras 7A. e 7C.). Os peptídeos apresentaram 100% de sensibilidade e de 100% de especificidade, considerando curvas ROC com área de 1 (Figuras 7B. e 7D.).

Figura 7. **A** e **C**: Soros de grupos assintomático, curado e sadio testados quanto à sua capacidade para se ligar ao peptídeo sintético LC1 e LC2. A linha horizontal corresponde o valor *cut-off* 0,11. **B**. Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor $p < 0,0001$ são indicados. no gráfico.



O peptídeo LT foi usado na detecção dos anticorpos para avaliar a sua capacidade de se ligar aos soros individuais de pacientes com leishmaniose tegumentar e de recém-nascidos. Ao comparar os grupos, observou-se diferença altamente significativa ($p < 0,0001$), valor de *cut-off* 0,11 com 100% de sensibilidade e especificidade na curva ROC com área correspondendo a 1 (Figuras 8A., 8B.). O diagnóstico atual (extrato proteico) revelou uma forte correlação, com $R^2 = 0,870$ e $y = 0.978x + 0.005$ (Figuras 8C., 8D.).

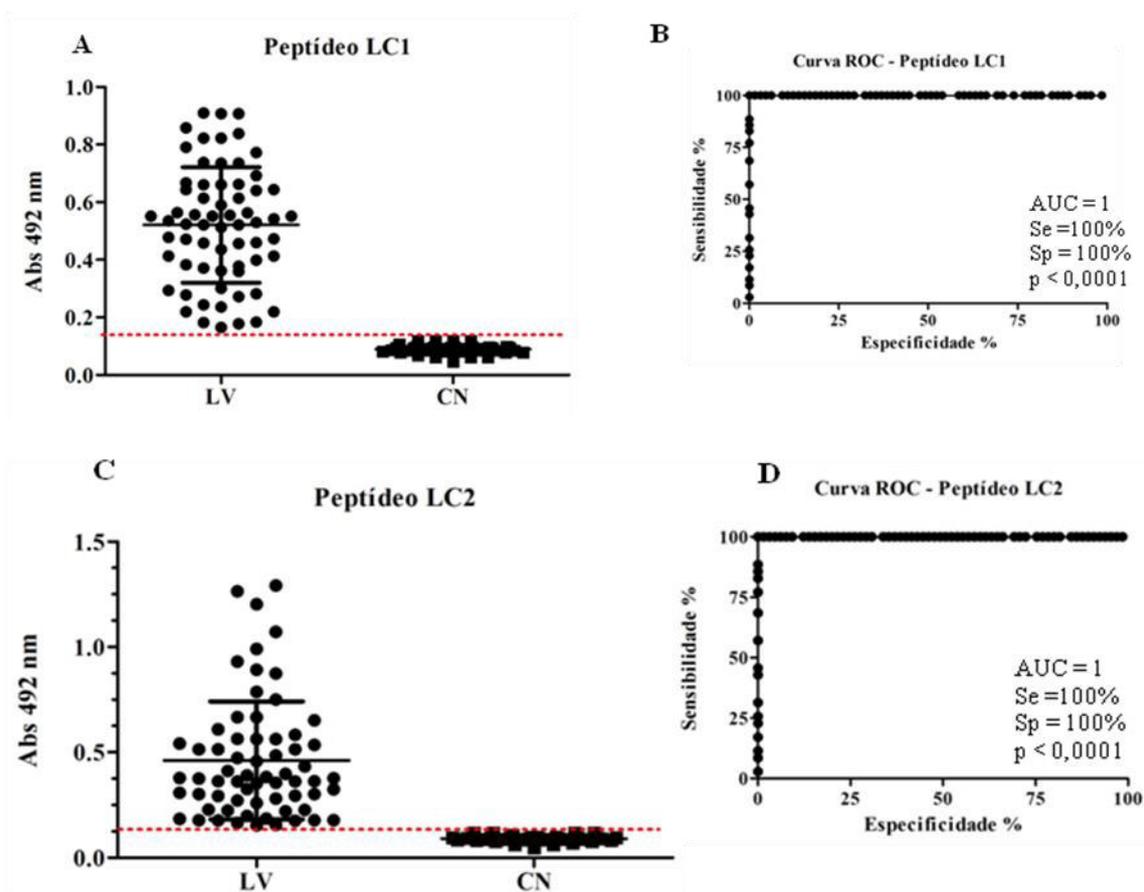
Figura 8. **A.** Detecção de anticorpos por ELISA utilizando o peptídeo LT em soros individuais de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT) e grupo de recém-nascidos usado como controle negativo (CN). A linha horizontal corresponde ao valor *cut-off* 0,11. **B.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor $p < 0,0001$ são indicados no gráfico. **C.** ELISA utilizando extrato proteico com de leishmaniose tegumentar (LT) e recém-nascidos (CN). **D.** Curva ROC apresentando a sensibilidade e especificidade.



6.1.3 Ensaio imunoenzimático com peptídeos sintéticos em saliva dos pacientes com leishmaniose

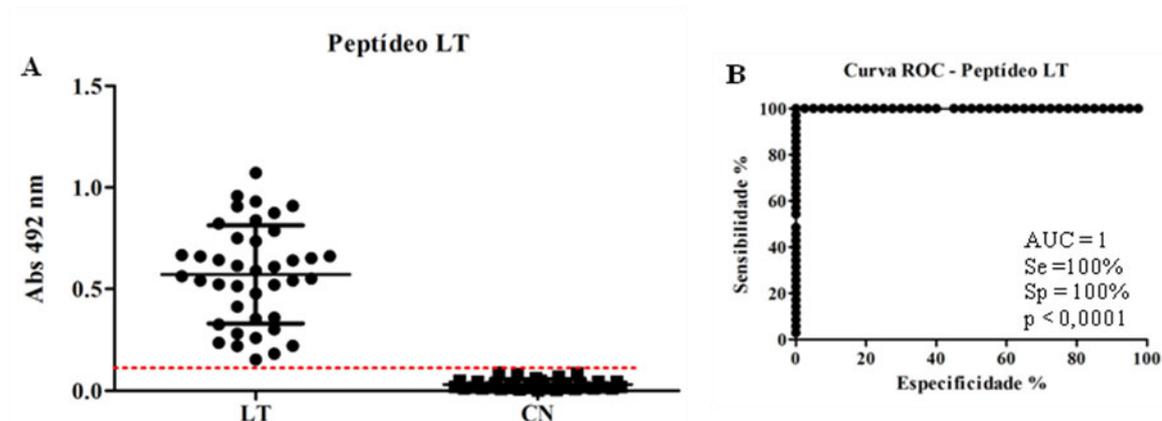
As salivas individuais dos pacientes com leishmaniose visceral e o grupo controle foram testados para avaliar a capacidade de se ligarem aos peptídeos LC1 e ao peptídeo LC2. O grupo dos pacientes quando comparado ao grupo controle apresentou diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) e um valor de valor de *cut-off* igual a 0,16 para o peptídeo LC1 e *cut-off* de 0,13 para o peptídeo LC1. A curva ROC mostra que o teste apresentou 100% sensibilidade e 100% de especificidade nos dois peptídeos testados (Figura 9).

Figura 9. **A. C.** Amostras de saliva de pacientes com leishmaniose visceral (LV) e grupo controle de amostras de indivíduos de área endêmica (CN). As salivas foram testadas individualmente quanto à sua capacidade para se ligar ao peptídeo sintético LC1 e ao peptídeo LC2. A linha horizontal corresponde o valor *cut-off* 0,16 (LC1) e 0,13 (LC2). **B. D.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e a especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor estão indicados no gráfico.



O peptídeo LT ao ser testado com saliva individual dos pacientes com leishmaniose tegumentar e o grupo controle apresentou diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) e *cut-off* 0,12. A curva ROC construída apresenta sensibilidade e especificidade de 100% (Figura 10).

Figura 10. **A.** Amostras de salivas de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT) e grupo controle de amostras de indivíduos de área endêmica (CN). As salivas foram testadas individualmente quanto à sua capacidade para se ligar ao peptídeo sintético LT. A linha horizontal corresponde o valor *cut-off* 0,12. **B.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor estão indicados no gráfico.

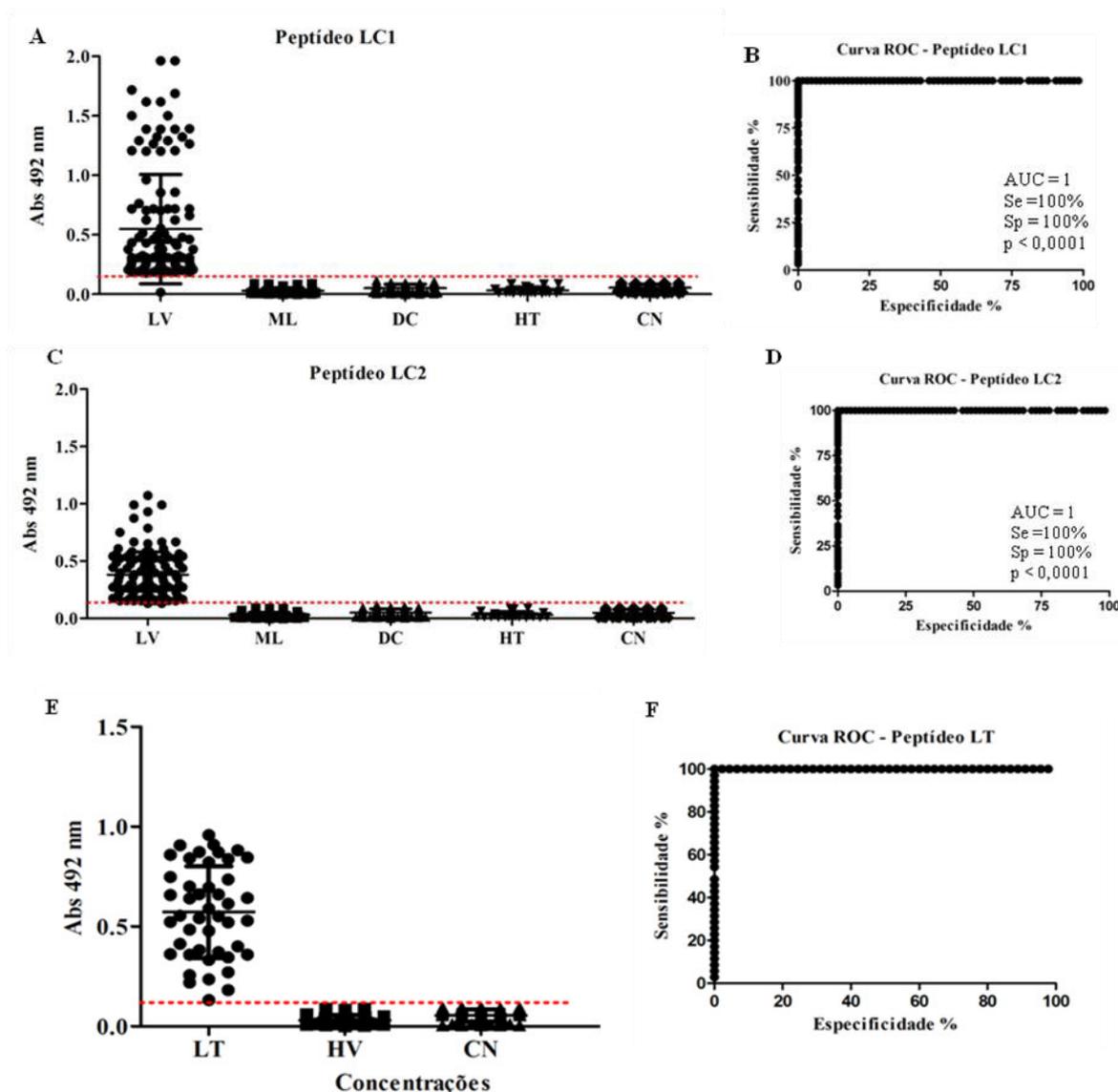


6.1.4 Reação cruzada dos peptídeos sintéticos

Após analisar a especificidade dos peptídeos LC1 e LC2 com soros individuais de pacientes LV, foi verificado se os peptídeos apresentavam reação cruzada com soros de Doenças de Chagas (n = 60), Malária (n = 65) e Hanseníase Tuberculóide (n = 20) doenças que compartilham sintomas com LV. Como controle negativo foi utilizado os soros de recém-nascidos.

Os peptídeos apresentaram diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando o grupo LV foi comparado ao controle negativo, grupo da Malária, da Doença de Chagas e da Hanseníase Tuberculóide apresentaram sensibilidade e especificidade de 100%, refletidas na curva ROC, comprovando que os peptídeos sintéticos LC1 e LC2 são específicos para LV (Figura 11).

Figura 11. **A. C. E.** Testes de reação cruzada com amostras de soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV), Malária (ML), Doenças de Chagas (DC), Hanseníase Tuberculoide (HT) e controle negativo (CN). A linha horizontal corresponde o valor *cut-off* 0,11. Teste de reação cruzada com amostras de soros de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT), Hanseníase Virchowiana (HV) e controle negativo (CN). **B. D. F.** Curva ROC apresenta 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva (AUC) e o correspondente valor estão indicados no gráfico.



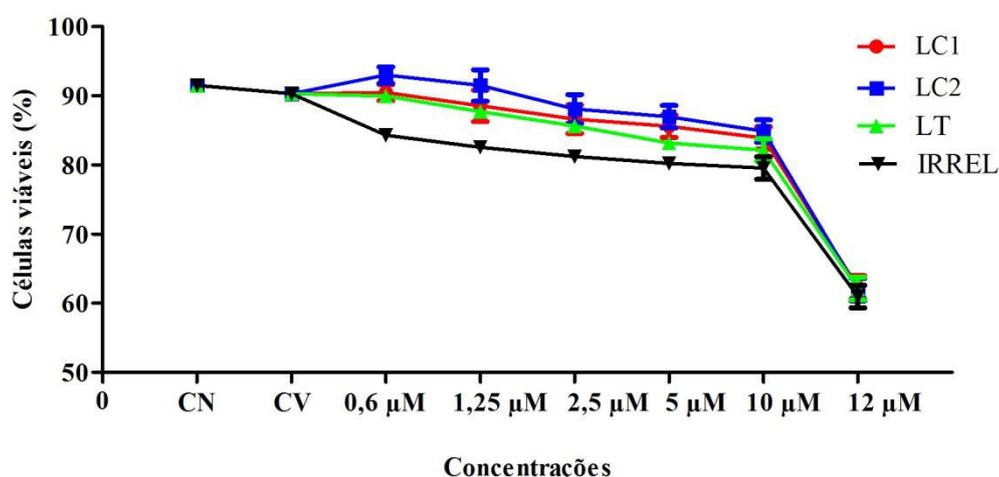
6.2 ABORDAGEM VACINAL

6.2.1 Ensaios *in vitro*

a) Viabilidade Celular

As análises de viabilidade celular foram realizadas a fim de determinar a concentração dos peptídeos sintéticos para leishmaniose (LC1, LC2, LT) e do peptídeo controle IRREL (Irrelevante) a serem utilizadas nos tratamentos. As concentrações testadas foram 0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 12 μM . As análises mostraram que, para os quatro peptídeos testados, a concentração acima de 10 μM induz viabilidade celular inferior a 70%, sendo por isso, descartadas (Figura 12).

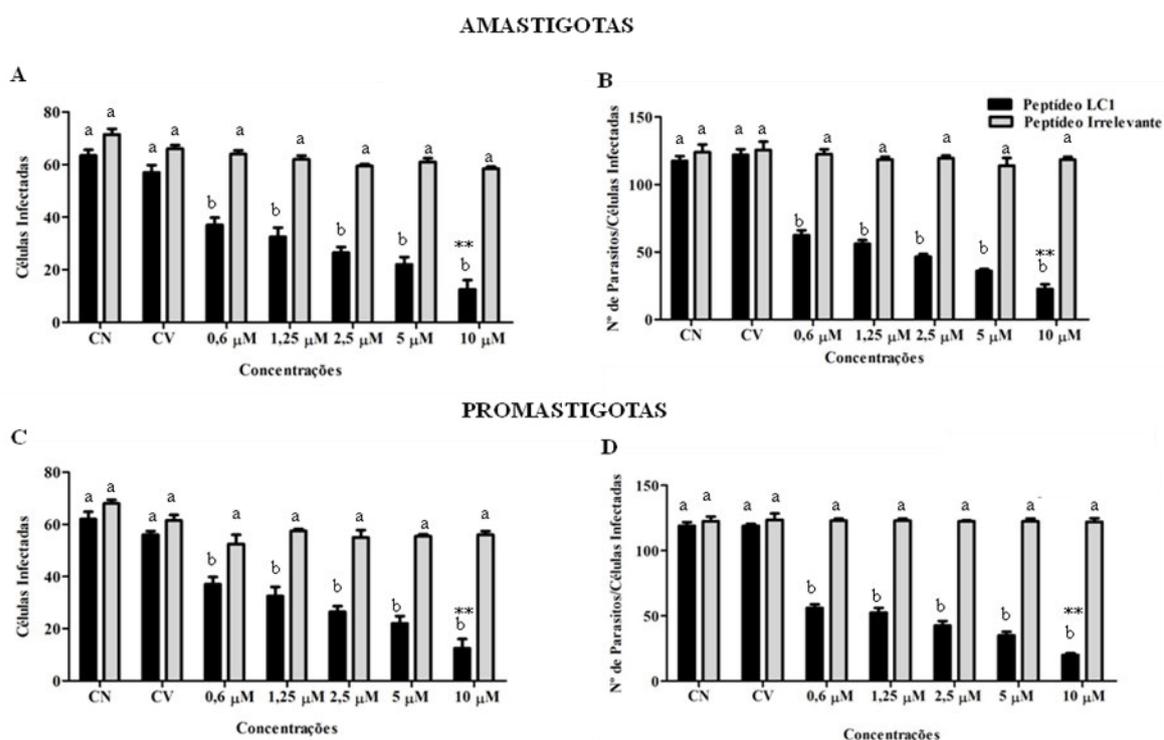
Figura 12. Ensaio de viabilidade celular pela resazurina em macrófagos C57BL/6 tratados com os peptídeos LC1, LC2, LT e IRREL.



b) Teste de invasão *in vitro*

Macrófagos da linhagem C57BL/6 foram tratados com o peptídeo LC1 e o peptídeo IRREL (irrelevante) por 2 horas nas concentrações de 0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM e infectados com formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania chagasi* por 4 horas. Ao comparar os animais tratados com os peptídeos e os controles, observou-se que LC1 diminuiu a invasão dos parasitos amastigotas e promastigotas em todas as concentrações ($p < 0,0001$). Entre os controles negativo e de veículo não houve diferença significativa. O mesmo resultado foi observado para o número de parasitas internalizados ($p < 0,0001$), sendo esse efeito maior para a dose de 10 μM . Entre os controles não houve diferença significativa (Figura 13).

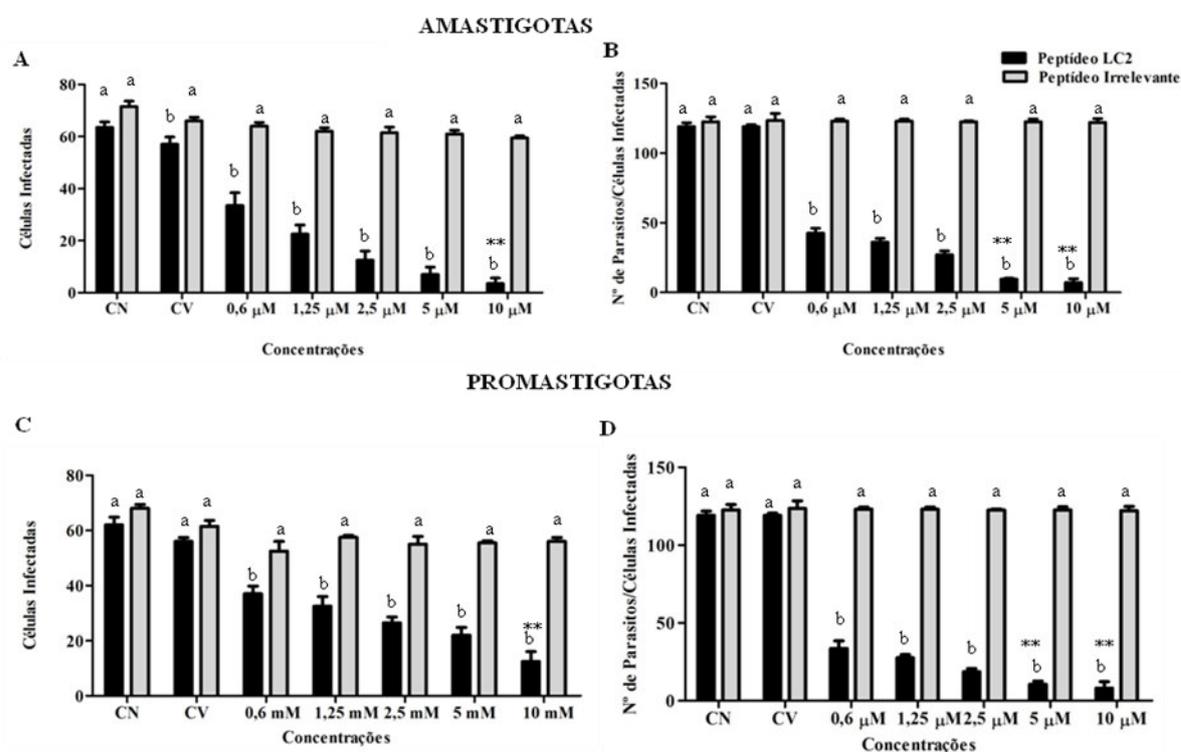
Figura 13. Macrófagos murinos C57BL/6 tratados com o peptídeo LC1 e Irrelevante por 2 horas nas concentrações 0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM , controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). **A.** Infecção por 4 horas com formas amastigotas (5:1) de *Leishmania infantum chagasi*. **B.** Índice de infecção (número de parasitos em 100 células infectadas). **C.** Infecção por 4 horas com formas promastigotas (5:1) de *Leishmania infantum chagasi*. **D.** Índice de infecção. Os dados representam média e desvio-padrão. Two way ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$). ** indica maior redução de células infectadas e de parasitos internalizados em relação as demais concentrações ($p < 0,0001$).



As células de murinos C57BL/6 foram tratadas por 2 horas com os peptídeos LC2 e peptídeo IRREL (irrelevante) nas mesmas concentrações (0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM), controle negativo (CN) e controle de veículo (CV) e infectados com formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum chagasi* por 4 horas. Ao analisar a invasão e comparar os grupos de tratamento, observou-se também que o grupo tratado com esse peptídeo apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) de células infectadas, bem como do número de parasitos amastigotas e promastigotas internalizados. Essa diminuição, mais uma vez, ocorreu em todas as concentrações do peptídeo, sendo maior para a concentração de 10 μM (células infectadas) e para as duas maiores concentrações (parasitas internalizados) (Figura 14). Não houve diferença

significativa no número de parasitas internalizados na maior concentração de peptídeos, tanto para amastigotas quanto promastigotas.

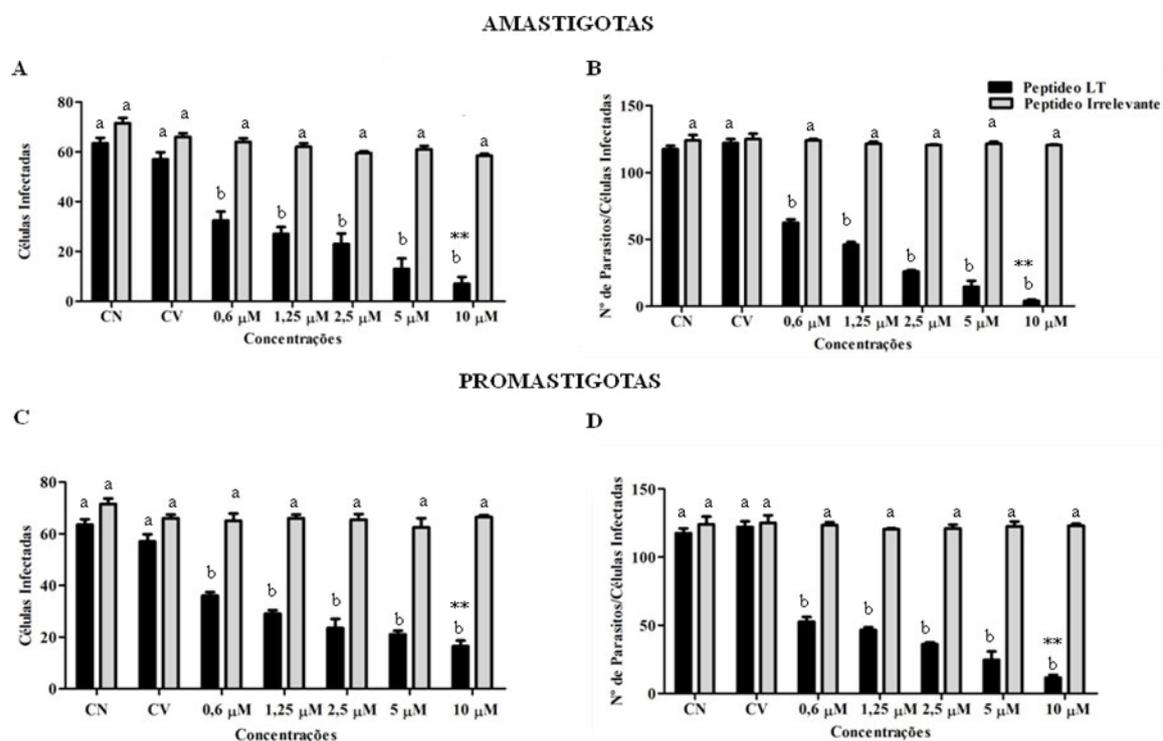
Figura 14. Macrófagos murinos C57BL/6 tratados com o peptídeo LC2 e IRREL (irrelevante) por 2 horas nas concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). **A.** Infecção por 4 horas com formas amastigotas (5:1) de *L. infantum chagasi*. **B.** Índice de infecção (número de parasitos em 100 células infectadas). **C.** Infecção por 4 horas com formas promastigotas (5:1) de *L. infantum chagasi*. **D.** Índice de infecção. **A. B.** Com o aumento da concentração diminuiu a invasão dos parasitos. **C. D.** O índice de infecção diminuiu com o aumento da concentração do peptídeo. Os dados representam média e desvio-padrão. Two way ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$). ** indica maior redução de células infectadas em relação as demais concentrações ($p < 0,0001$).



Ao tratar as células de murinos da linhagem C57BL/6 com o peptídeo LT e o peptídeo IRREL por 2 horas nas seguintes concentrações: 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo e controle de veículo e, posteriormente, infectá-las com formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*. Ao analisar a infecção, observou-se que o tratamento com o peptídeo LT quando comparado ao peptídeo IRREL apresentou uma diferença altamente significativa ($p < 0,0001$), ou seja, a diminuição das células infectadas diminuiu em todas as concentrações, o mesmo

ocorreu para o índice de infecção (número de parasitas internalizados), sendo maior o efeito para a maior concentração testada (Figuras 15).

Figura 15. Macrófagos murinos C57BL/6 tratados com o peptídeo LT e IRREL (irrelevante) por 2 horas nas concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). **A.** Infecção por 4 horas com formas amastigotas (5:1) de *L. amazonensis*. **B.** Índice de infecção (número de parasitos em 100 células infectadas). **C.** Infecção por 4 horas com formas promastigotas (5:1) **D.** Índice de infecção. **A. B.** Com o aumento da concentração diminuiu a invasão dos parasitos. **C. D.** O índice de infecção diminuiu com o aumento da concentração do peptídeo. Os dados representam média e desvio-padrão. Two way ANOVA; teste de Bonferroni. Letras iguais: Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$). ** indica maior redução de células infectadas e de parasitos internalizados em relação as demais concentrações ($p < 0,0001$).



c) Ensaio de multiplicação *in vitro*

A redução do número de parasitos foi altamente significativa nos testes de invasão, baseado nisso, procedeu-se a realização dos testes de multiplicação em diferentes tempos de tratamento dos peptídeos sintéticos.

Macrófagos infectados com formas amastigotas ou promastigotas de *L. infantum chagasi* foram expostas aos peptídeos LC1 e IRREL durante 24 h, 48 h, 72h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo e

controle de veículo. Nos tratamentos com LC1 foi observado que a multiplicação dos parasitos quando comparado ao controles de veículo, controle negativo e ao tratamento com o peptídeo IRREL apresentou diferença altamente significativa ($p < 0,0001$), ou seja, o peptídeo LC1 foi capaz de diminuir a multiplicação do parasito internalizado no macrófago. Este efeito foi significativamente maior para as maiores concentrações testada (5 μM e 10 μM). Entre os controles não houve diferença significativa (Figuras 16 e 17).

Figura 16. Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com amastigotas (1:1) de *L.infantum chagasi* expostos ao peptídeo LC1, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μM ; 1,25 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). A redução da multiplicação do parasita com o aumento da concentração em todos os tratamentos (A. B. C. D). *Two-way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.

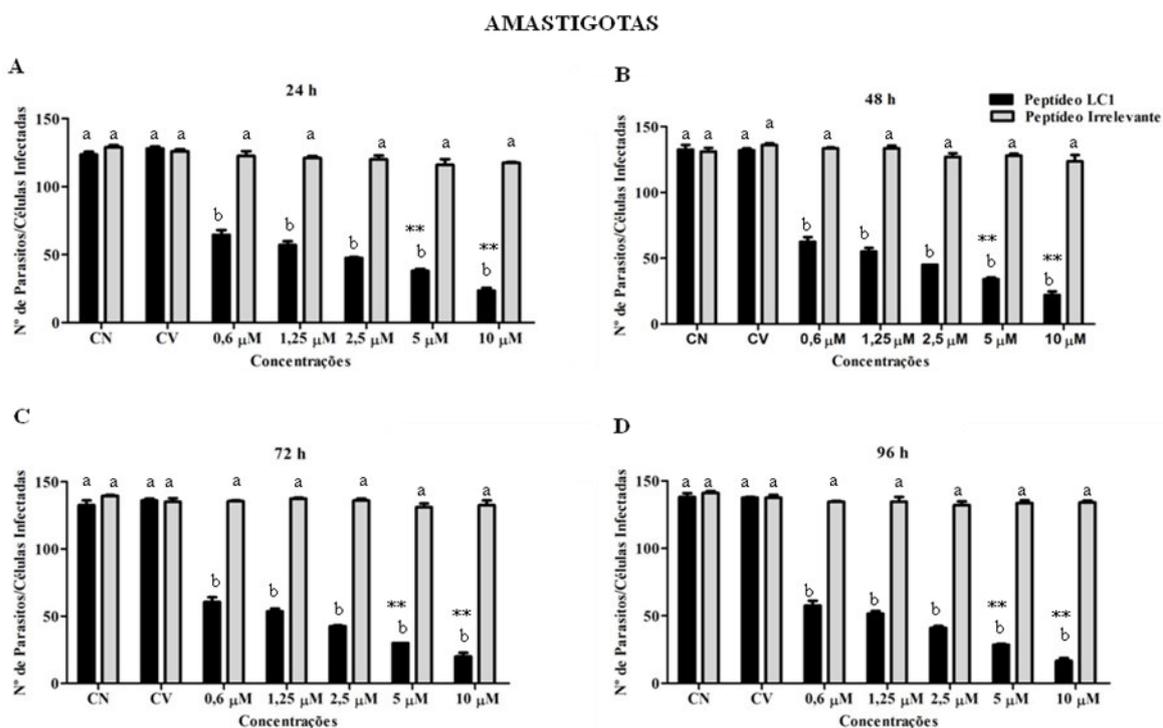
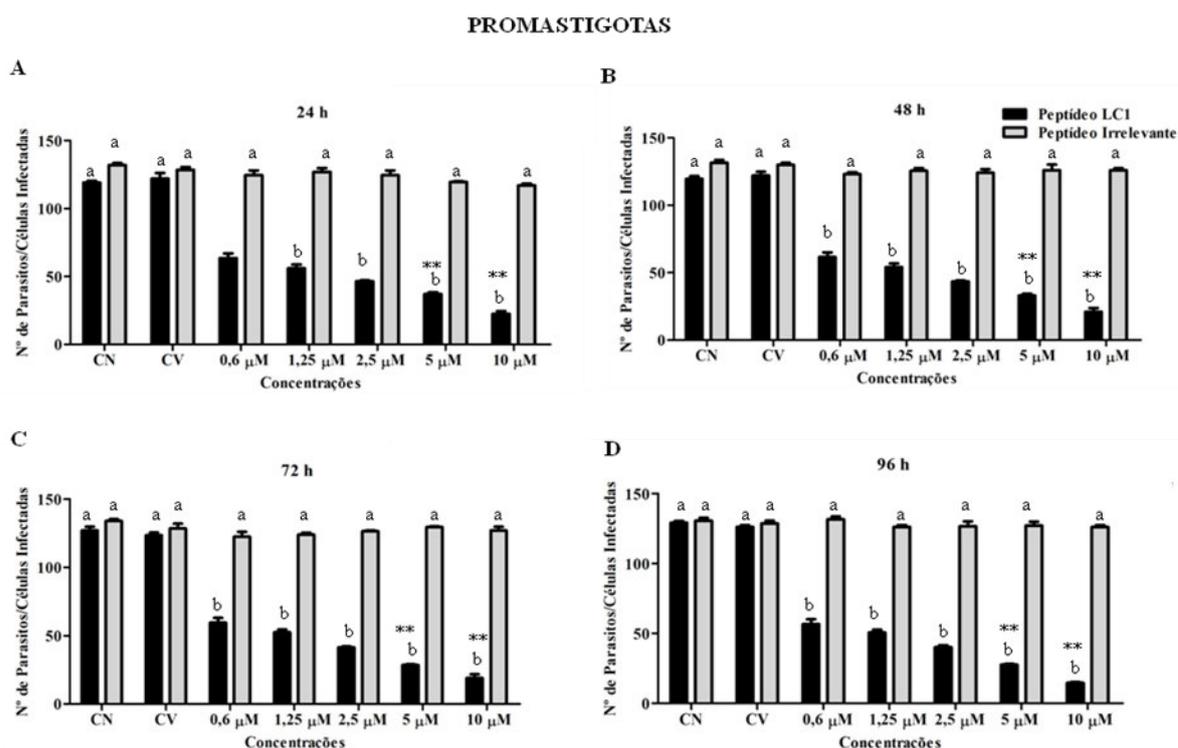


Figura 17. Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com promastigotas (1:1) de *L. infantum chagasi* tratados com o peptídeo LC1, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M controle negativo (CN), controle de veículo (CV). A redução da multiplicação do parasita com o aumento da concentração em todos os tratamentos. *Two-way* ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.



Células de murinos da linhagem C57BL/6 infectados com formas amastigotas ou promastigotas de *L. infantum chagasi* foram tratadas com os peptídeos LC2 e IRREL durante 24 h, 48 h, 72h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo e controle de veículo. Nos tratamentos com LC2 foi observado que a multiplicação dos parasitos, quando comparado ao controles de veículo, controle negativo e ao tratamento com o peptídeo IRREL, apresentou diferença altamente significativa ($p < 0,0001$), ou seja, o peptídeo LC2 foi capaz de diminuir a multiplicação do parasito internalizado no macrófago. Este efeito foi significativamente

maior para as maiores concentrações testadas (5 μ M e 10 μ M). Entre os controles não houve diferença significativa (Figuras 18 e 19).

Figura 18. Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com amastigotas (1:1) de *L. infantum chagasi* tratados com o peptídeo LC2, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M controle negativo (CN), controle de veículo (CV) (em triplicata). A redução da multiplicação do parasita com o aumento da concentração em todos os tratamentos. Two way ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.

AMASTIGOTAS

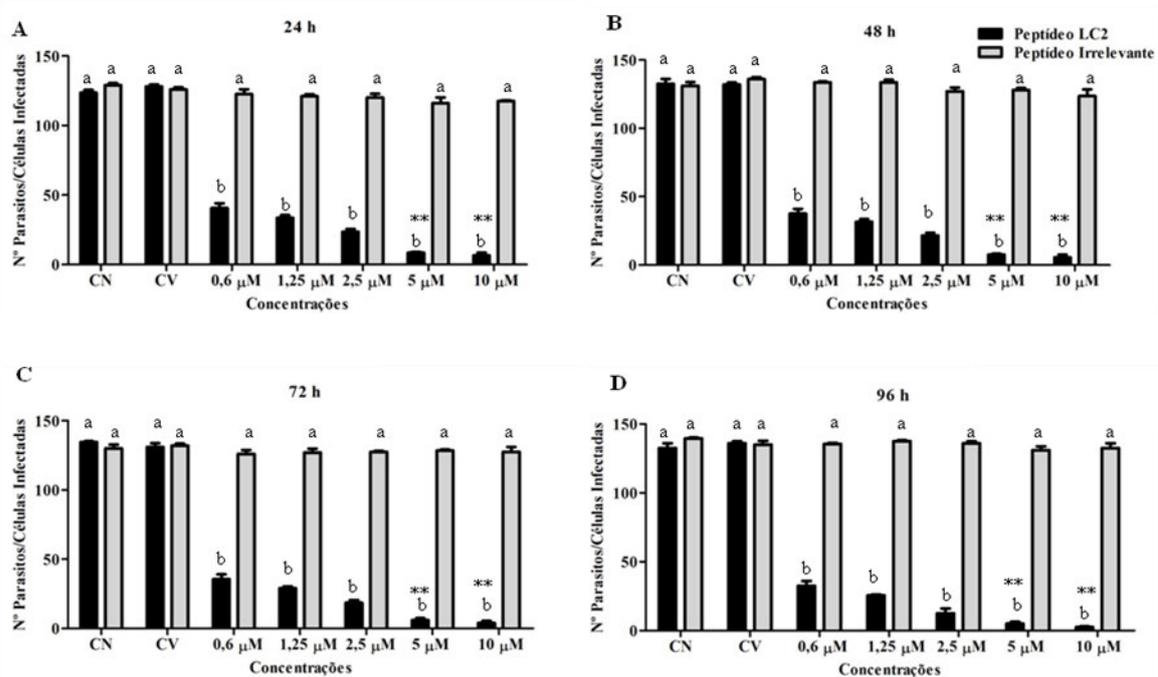
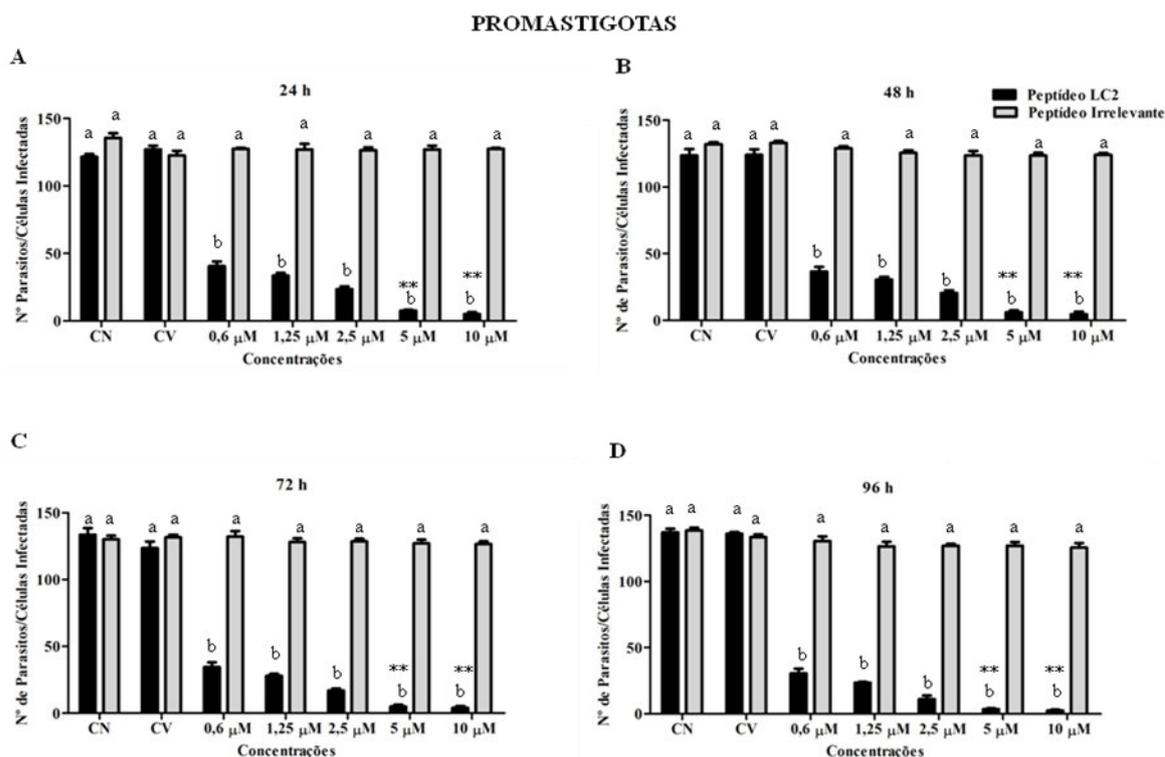


Figura 19. Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com promastigotas (1:1) de *L. infantum chagasi* tratados com o peptídeo LC2, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M controle negativo (CN), controle de veículo (CV). Two way ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.



Macrófagos de murinos da linhagem C57BL/6 infectados com formas amastigotas ou promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com os peptídeos LT e IRREL durante 24 h, 48 h, 72h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo e controle de veículo. Nos tratamentos com LT foi observado que a multiplicação dos parasitos, quando comparado ao controles de veículo, controle negativo e ao tratamento com o peptídeo IRREL, apresentou diferença altamente significativa ($p < 0,0001$), ou seja, o peptídeo LT foi capaz de diminuir a multiplicação do parasito internalizado no macrófago. Este efeito foi significativamente maior para as maiores concentrações testadas (5 μ M e 10 μ M). Entre os controles não houve diferença significativa (Figuras 20 e 21).

Figura 20. Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com amastigotas (1:1) de *L. amazonensis* tratados com o peptídeo LT, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo (CN), controle de veículo (CV). Os dados representam média e desvio-padrão. Two-way ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.

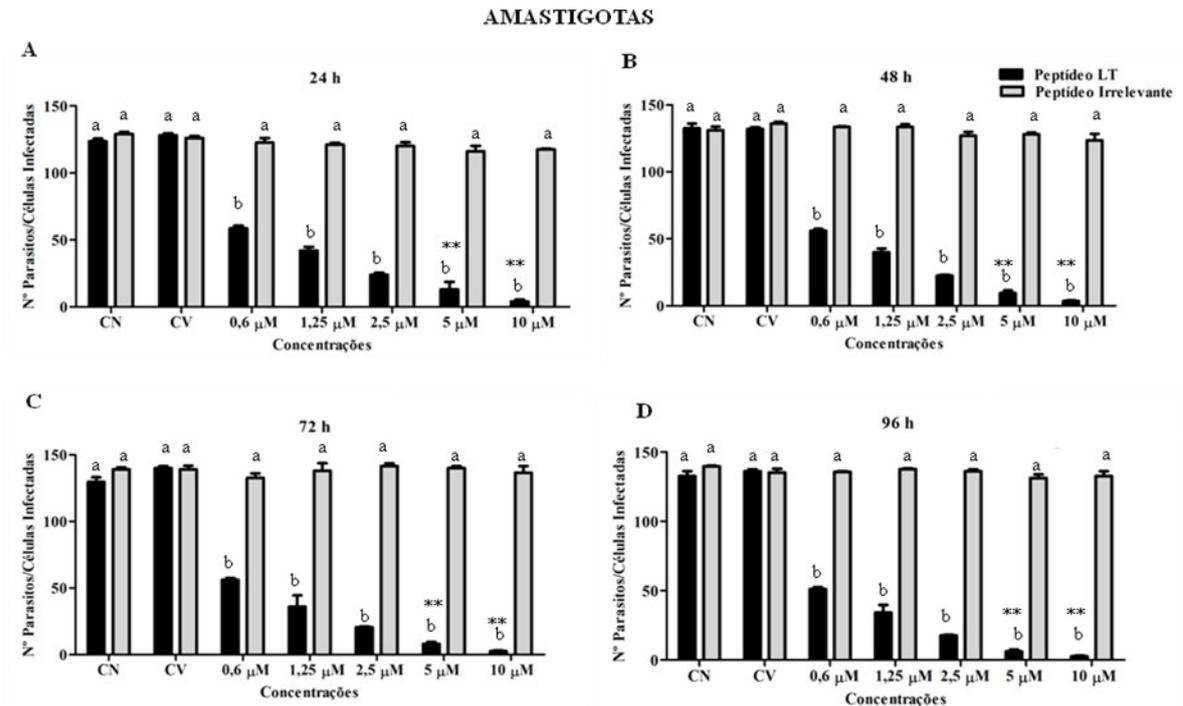
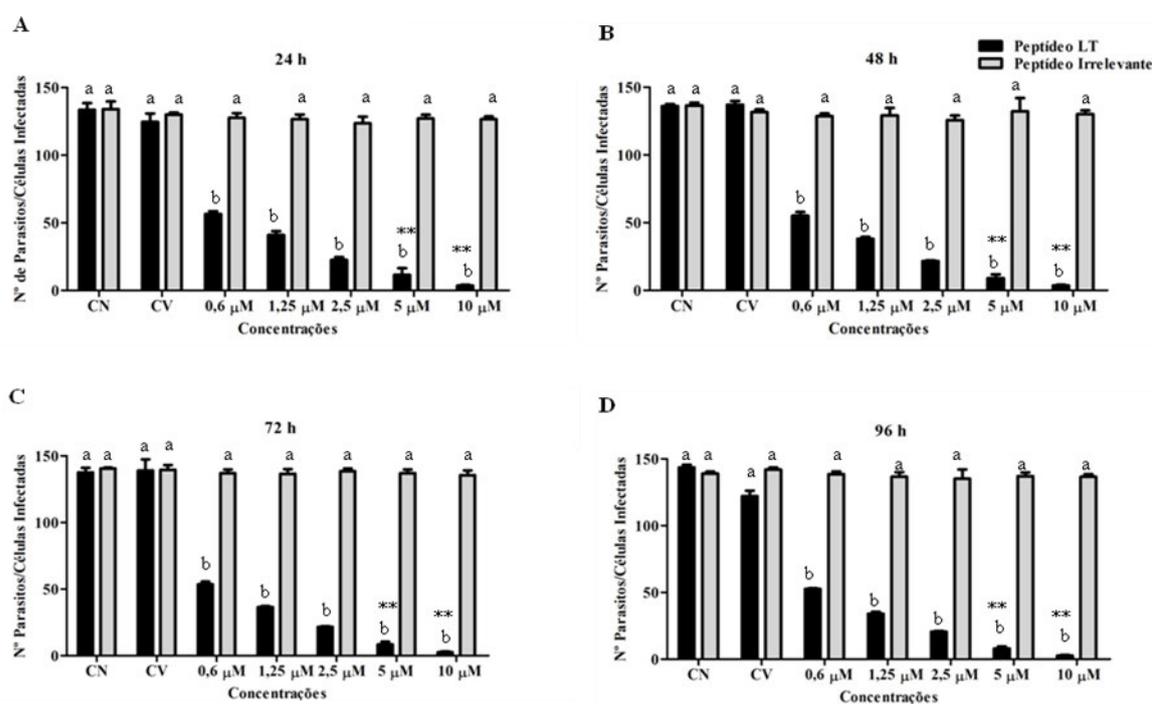


Figura 21. Macrófagos murinos C57BL/6 infectados com promastigotas (1:1) de *L. amazonensis* tratados com o peptídeo LT, IRREL, controle negativo e controle de veículo durante 24 h, 48 h, 72 h e 96 h nas seguintes concentrações 0,6 μ M; 1,25 μ M; 2,5 μ M; 5 μ M; 10 μ M, controle negativo (CN), controle de veículo (CV). Os dados representam média e desvio-padrão. Two way ANOVA; teste de Bonferroni. Letras diferentes: há diferença altamente significativa ($p < 0,0001$) quando as concentrações são comparadas aos controles. ** não diferem entre si e diferem das demais concentrações.

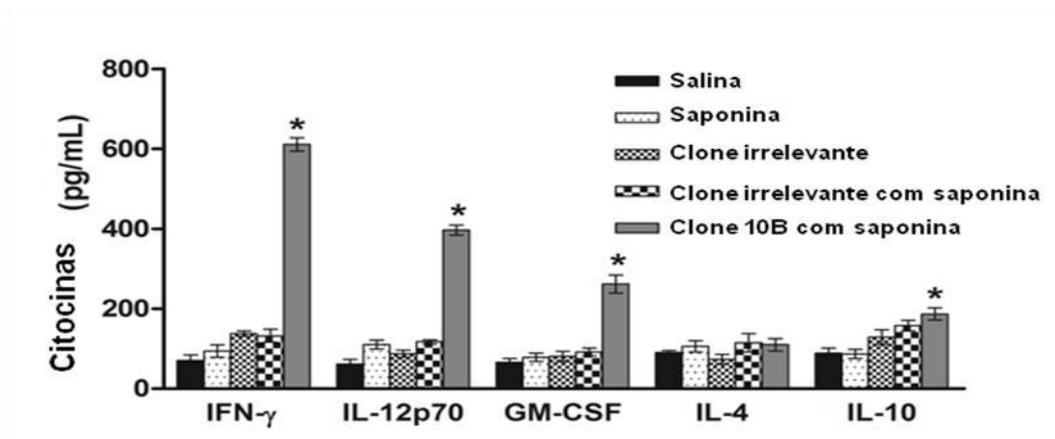
PROMASTIGOTAS



6.2.2 Ensaio *in vivo* - Potencial protetor do peptídeo mimético 10B contra *L. amazonensis*

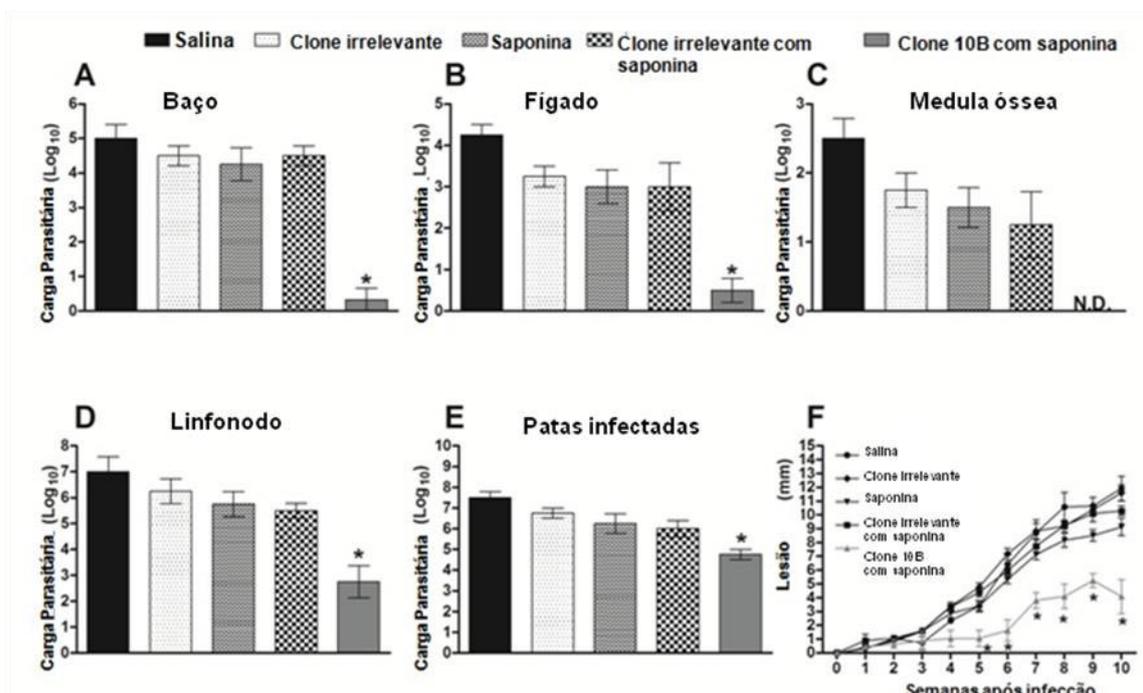
A imunogenicidade do clone 10B associada com saponina foi avaliada em camundongos BALB/c depois de um programa de imunização. Após estimulação, as células do baço dos camundongos vacinados produziram níveis significativamente mais elevados de IFN- γ , IL-12, GM-CSF e IL-10 quando comparadas ao grupo controle (salina, saponina, clone irrelevante e clone irrelevante com saponina), não tendo sido observado aumento na produção de IL-4 (Figura 22).

Figura 22. Imunogenicidade do clone 10B associada com saponina contra *L. amazonensis*. Células de baço obtidas a partir de camundongos após 10 semanas de imunização com o clone 10B e os controles. Cada barra representa a média \pm DP dos dados de quatro camundongos. Diferenças estatisticamente significativas em IFN- γ , IL-12, GM-CSF e IL-10 entre o grupo clone 10B mais saponina e os controles foram observadas (* $p < 0,005$).



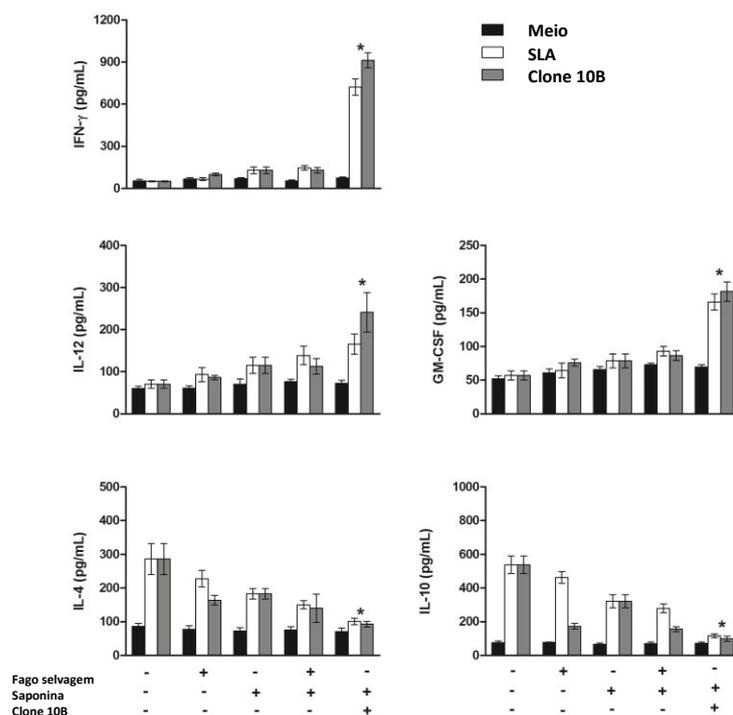
Para avaliar se o clone 10B associado com saponina foi capaz de induzir proteção contra *L. amazonensis*, os camundongos infectados foram acompanhados durante 10 semanas e quantificada a carga parasitária no baço (Figura 23A.), fígado (Figura 23B.), medula óssea (Figura 23C.), lifonodo (Figura 23D.) e na pata infectada (Figura 23E.). Foi observado que o número de parasitas reduziu significativamente nos órgãos analisados dos camundongos vacinados quando comparados com o controle ($p < 0,0001$). Os camundongos imunizados com o clone 10B associado com saponina apresentaram reduções significativas na lesão na pata após cinco semanas de infecção em comparação com os grupos controle ($p < 0,005$).

Figura 23. Quantificação da carga parasitária após 10 semanas da infecção por *L. amazonensis* nos órgãos: baço (A), fígado (B), medula óssea (C), linfonodo (D) e patas infectadas (E). Cada barra representa a média \pm DP dos dados de cada camundongo ($n = 4$). Diferenças significativas da carga parasitária entre o grupo tratado com clone 10B mais saponina e os grupos controles ($*p < 0,0001$). N.D. Não detectado. (F) Desenvolvimento da lesão na pata de camundongos imunizados com clone 10B associado com saponina após o desafio com *L. amazonensis*. Os dados representam a média \pm DP de quatro camundongos em cada grupo. Diferenças estatisticamente significativas na lesão da pata entre o grupo tratado com clone 10B mais saponina e os grupos controle foram observadas ($* p < 0,005$).



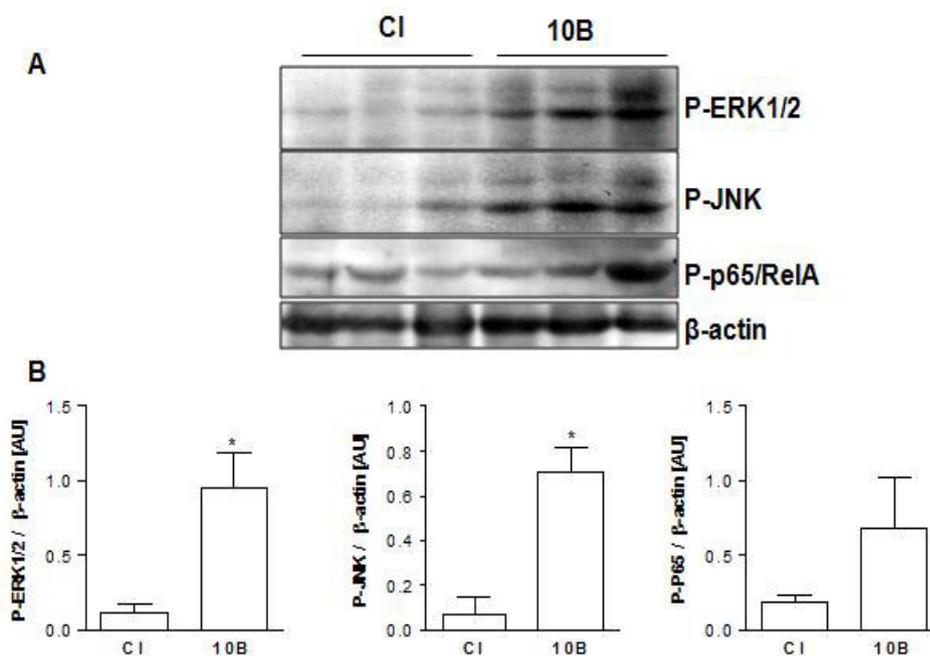
Após o desafio, a produção de citocinas foi analisada nos sobrenadantes das células do baço dos camundongos estimulados com o clone 10B e extrato proteico (SLA) para avaliar a proteção induzida pelo clone 10B. As células do baço dos animais vacinados com o clone 10B associado com saponina produziram níveis mais elevados de IFN- γ , IL-12, GM-CSF, enquanto IL-4 e IL-10 apresentam níveis menores quando comparados ao grupo tratado com SLA e aos grupos controle após 10 semanas de infecção (Figura 24).

Figura 24. Resposta imune celular induzida pelo clone 10B associado com saponina após a infecção. As células do baço obtidas de camundongos imunizados com o clone 10B associado a saponina e os controles. Cada barra representa a média \pm DP dos dados de quatro camundongos. Diferenças estatisticamente significativas para GM-CSF, IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 entre os níveis do clone 10B grupo mais saponina e os grupos controles foram observadas (* $p < 0,0001$).



Para verificar as vias de sinalização que estão relacionadas com a resposta imune induzida pelo clone 10B contra *L. amazonensis*, foram analisados os níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK e p65/RelA extraídas das patas dos camundongos. Aumento dos níveis de fosforilação de algumas proteínas MAPK (ERK1/2 e JNK) e NF- κ B (p65/RelA) foram observados no grupo de camundongos que foi imunizado pelo clone 10B associado com saponina quando comparado com os que receberam PBS (Figura 25). A análise densitométrica de cada nível de fosforilação comparada com β -actina mostrou aumento com diferenças estatisticamente significativas para todas proteínas testadas ($p < 0,05$).

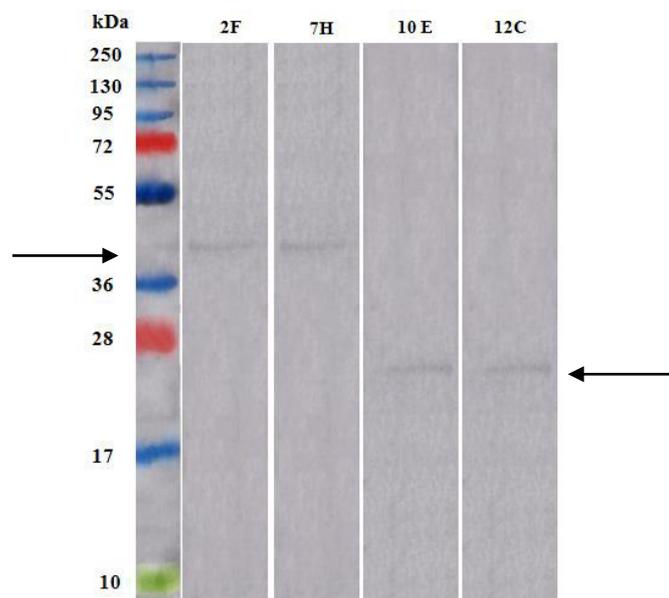
Figura 25. Níveis de fosforilação de ERK1/2, JNK e p65/RelA de proteínas extraídas da pata do camundongo imunizado com o clone 10B associado com saponina seguido do desafio com *L. amazonensis*. **A:** Extrato das proteínas P-ERK1/2, anti-JNK ou anti P-p65 (topo), ou anti- β -actina. **B:** Análise densitométrica através do *software* LabImage software. Os resultados são expressos como a média de três camundongos. * $p < 0,05$ quando comparado com camundongos tratados com PBS.



6.3. Identificação da proteína de ligação do anticorpo recombinante

O ensaio com os anticorpos recombinantes permitiu identificar duas proteínas para *L. amazonensis* com aproximadamente 42 KDa e duas para *L. infantum chagasi* com aproximadamente 26 KDa (Figura 26).

Figura 26. *Western Blot* das proteínas ligantes aos anticorpos recombinantes 2F, 7H referentes à *L. amazonensis*, de aproximadamente 42 Kda; 10 E e 12 C referentes à *L. infantum chagasi*, de aproximadamente 26 Kda.



7. DISCUSSÃO

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre vários elementos que compõem a cadeia de transmissão e evolução clínica das leishmanioses, as estratégias de controle ainda são poucos efetivas e estão centradas no diagnóstico precoce e, embora existam várias técnicas disponíveis, nenhuma apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (MATLASHEWSKI et al., 2001; GONTIJO E MELO, 2004; BRASIL 2014; ELMAHALLAWY et al., 2014).

Assim, é necessário o desenvolvimento de novas ferramentas que permitam um diagnóstico mais sensível e mais específico, incluindo novos marcadores de infecção. Nesse sentido, este presente trabalho propôs a validação de antígenos miméticos de *Leishmania* para aplicação diagnóstica e vacinal.

Peptídeos miméticos mostram-se como fortes candidatos na busca de novos biomarcadores pelo fato dessas moléculas imitarem antígenos específicos de determinados patógenos, pelo menos em um epítipo particular (GOULART, 2010). Nesse sentido, a tecnologia *Phage display* é pioneira em selecionar esses peptídeos e

tem provado ser útil na seleção de moléculas específicas que são altamente reativas contra uma variedade de alvos biológicos (SMITH, 1985; COSTA et al., 2014).

Baseado nisso, peptídeos recombinantes sintéticos selecionados por *Phage display* foram testados em ensaios imunoenzimáticos utilizando soro e saliva individuais de pacientes infectados com *Leishmania infantum chagasi* (LC1 e LC2) ou *Leishmania amazonensis* (LT), os quais apresentaram alta sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos circulantes de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar, respectivamente.

O peptídeo LC1 apresentou 98,4% de sensibilidade e 100% de especificidade, enquanto LC2 mostrou 100% de sensibilidade e de especificidade quando testados em soros individuais de pacientes, revelando maior sensibilidade, especificidade e reatividade, quando comparado ao ensaio imunoenzimático que utiliza o complexo de extrato proteico do parasito, atualmente utilizado para o diagnóstico, cuja sensibilidade varia de 71% a 100% e especificidade, entre 85% a 100% em soro de pacientes. Houve também uma forte correlação com o ensaio ELISA usando os peptídeos recombinantes e o extrato proteico.

Os resultados de testes sorológicos utilizando imunofluorescência indireta (RIFI) ou ELISA (com antígenos brutos do parasito) não são conclusivos, pois um teste positivo necessariamente não indica doença ativa (GONTIJO E MELO, 2004). Entretanto, resultados recentes em uma série de pacientes de São Paulo residentes em uma área endêmica de leishmaniose visceral apresentaram positividade em torno de 90% dos casos (GOTO et al., 2005). A importância da escolha do antígeno foi mencionada por Gontijo e Melo (2004), pois o uso de antígenos totais ou de parasitas inteiros, frequentemente resultam em uma baixa especificidade na detecção de anticorpos específicos para a doença.

Alguns estudos relatam que a utilização do antígeno bruto ou total limita a especificidade propiciando reações cruzadas com outros tripanossomatídeos (CABALLERO et al., 2007; MATOS et al., 2015). Nossos resultados mostraram que os peptídeos recombinantes LC1 e LC2 não apresentaram reação cruzada com doença de Chagas, Malária e Hanseníase Tuberculoide, ressaltando a maior especificidade destes peptídeos miméticos, o que tem grande relevância no diagnóstico, sobretudo nos locais nos quais é compartilhada a ocorrência de diferentes doenças, cujas apresentações clínicas se sobrepõem. Importante ressaltar também que os peptídeos foram capazes de

detectar infecção em indivíduos assintomáticos, sendo, portanto uma promissora ferramenta para controle e monitoramento da epidemiologia da infecção em regiões endêmicas.

O diagnóstico da leishmaniose visceral pode ser realizado em diferentes tipos de amostras biológicas, tais como aspirado de medula e de nódulos linfáticos, cuja especificidade varia de 52 a 85% (TAVARES et al., 2003). Esses métodos são também invasivos, arriscados e dolorosos, exigindo pessoal qualificado para realizá-lo (SIGH et al., 2009).

Muitos trabalhos apontam que o teste imunocromatográfico utilizando o antígeno de *Leishmania* rk39, considerado um teste de diagnóstico rápido, descrito inicialmente com alta sensibilidade, mas cuja sensibilidade está diminuindo para valores abaixo dos iniciais, tais como 61,5-92%; 72,4%; 45,6%. Essa redução tem sido justificada pela perda rápida da validade do teste (CUNNINGHAM et al., 2012; COTA, 2013; MOURA et al., 2013).

Ainda não está bem esclarecido se a infecção por HIV é capaz de interferir nos testes sorológicos atualmente em uso em pacientes com coinfeção LV-HIV (GOTO et al., 2005), mas, ainda assim, o Ministério da Saúde (2014) recomenda a sorologia para todos os pacientes com coinfeção, independentemente da idade. Dessa forma, neste trabalho foi investigada a sensibilidade na detecção de anticorpos específicos para leishmaniose visceral em pacientes HIV-positivos, os quais apresentaram uma sensibilidade e especificidade de 100%, revelando que a presença do vírus HIV não interfere no diagnóstico sorológico utilizando ambos os peptídeos (LC1 e LC2). Outros trabalhos utilizando o anticorpo rk-39, encontraram resultados semelhantes aos nossos (BRAZ et al., 2002; DENIAU et al., 2003; LEMOS et al., 2003).

Nossos resultados também revelaram que os peptídeos miméticos LC1 e LC2 são capazes de identificar os pacientes infectados assintomáticos, semelhantemente com os dados obtidos em testes sorológicos utilizando rk39 (SUNDAR et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2010; MATLASHEWSKI et al., 2013; BANU et al., 2016)

O diagnóstico de leishmaniose tegumentar consiste inicialmente na realização da Intradermoreação de Montenegro (IDRM), seguida de testes sorológicos para detectar anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes, cuja sensibilidade varia de 75% a 94,7% e, a especificidade atinge 100% (GONTIJO E CARVALHO, 2003). Em

nossos resultados, o peptídeo mimético LT apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, revelando-se mais sensível e específico.

Alguns trabalhos têm também sugerido o diagnóstico de leishmaniose tegumentar pela detecção do DNA do parasita em lesões por meio da PCR. Apesar da sua alta especificidade, este método diagnóstico requer normalizações de protocolo extensas devido à sua sensibilidade variável (OLIVEIRA et al., 2011), especialmente ao se considerar o baixo número de parasitas nas lesões, levando a resultados falso-negativos (BOGGILD et al., 2011; LUNEDO et al., 2012).

Alguns trabalhos apontam os peptídeos sintéticos e/ou a combinação deles para melhorar o diagnóstico das leishmanioses. Costa et al. (2012) identificaram diferentes peptídeos e testaram em soros de 44 pacientes com leishmaniose visceral e observaram que a sensibilidade e especificidade aumentava ao misturar diferentes peptídeos, podendo atingir 100% de sensibilidade e especificidade, porém não foram testadas reações cruzadas. Nossos dados demonstram que os peptídeos LC1, LC2 e LT apresentam alta sensibilidade e especificidade quando testados individualmente e não apresentaram reação cruzada com Doenças de Chagas, Malária e Hanseníase, o que os tornam alvos promissores para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana, com alta especificidade, sensibilidade e de menor custo, sendo possível testar futuramente a reatividade desses peptídeos combinados.

A fim de otimizar o teste diagnóstico, aplicando-o em amostra biológica obtida de maneira menos invasiva, a reatividade dos peptídeos foi avaliada também na saliva de pacientes com leishmaniose visceral. A saliva apresenta características importantes que a torna um bom alvo para ser testado, tais como, facilidade de coleta e transporte do material, o que permite sua utilização em locais endêmicos, que normalmente apresentam infraestrutura restrita (LAWRENCE, 2002; PHUMEE et al., 2013). LC1 e LC2 quando testados no ensaio imunoenzimático utilizando a saliva individual de pacientes com leishmaniose visceral apresentaram sensibilidade e especificidade de 100%. Vaish et al. (2012) também encontraram uma alta sensibilidade e especificidade (83,3% e 100%, respectivamente) em amostras de saliva, embora em teste sorológico a sensibilidade tenha sido baixa.

A alta performance diagnóstica dos peptídeos testados neste trabalho, tanto para leishmaniose visceral (LC1 e LC2) quanto tegumentar (LT), isoladamente, quanto no

caso de coinfeção LV-HIV, podem ser comprovados por meio das curvas ROC obtidas para todos os ensaios imunoenzimáticos.

Alguns estudos propõem que antígenos de parasitas que são reconhecidos por anticorpos presentes em soros podem ser bem associados com uma resposta protetora, e poderia representar candidatos potenciais de vacina e/ou terapia contra leishmanias, com maior especificidade devido aos sítios específicos dos antígenos (HELL et al., 2009; COELHO et al., 2009; COELHO et al., 2012). Baseado nisto, macrófagos C57BL/6 foram tratados com os peptídeos sintéticos LC1, LC2 E LT e infectados com amastigotas e promastigotas a fim de analisar a infectividade do parasito.

Os resultados observados em relação a interação entre os peptídeos sintéticos e os macrófagos demonstram uma resposta celular frente ao antígeno, refletida na diminuição significativa da infecção nessas células, bem como no número de ambos os parasitas internalizados (*L. infantum chagasi* e *L. amazonensis*), semelhantemente ao que foi observado por García et al. (2008) ao tratar células sanguíneas com peptídeo específico para *Plasmodium falciparum*. Rhaiem e Houimel (2016), ao investigarem *in vitro* a eficácia de altas concentrações de peptídeos (100 µM) em inibir *L. major* em monócitos humanos infectados, encontraram um potencial significativo de bloqueio para dois peptídeos. Nossos achados também revelaram uma redução no número de células infectadas e no número de parasitas promastigotas internalizados em macrófagos, sendo este efeito dependente da concentração dos peptídeos (LC1, LC2 e LT), sendo mais efetivas as maiores concentrações.

Com objetivo de analisar o efeito do tratamento dos peptídeos quanto à multiplicação dos parasitas, nas suas formas amastigotas e promastigotas, as células foram expostas aos peptídeos em diferentes tempos (24 h, 48 h, 72 h e 96 h). Para todos os tempos de exposição houve redução do número de parasitos internalizados, sendo observado um efeito maior nas duas maiores doses. Costa et al. (2012) avaliaram dois peptídeos sintéticos testados contra *L. amazonensis* e verificaram também uma redução na multiplicação dos parasitas em macrófagos infectados.

Os resultados *in vitro* apresentados neste trabalho sugerem que os peptídeos mimetizam proteínas do parasito que podem ter importante papel na interação parasito-hospedeiro, podendo ser alvos importantes na geração de imunidade ao parasita. Com base nessa hipótese foram realizados ensaios para testar o potencial protetor do peptídeo mimético em camundongos infectados por *L. amazonensis*. Nossos dados revelaram um

aumento significativo de IFN- γ e IL-12 nos animais infectados e imunizados com o clone 10B, enquanto os níveis de IL-4 e IL-10 foram reduzidos revelando a capacidade do peptídeo mimético em induzir resposta imune protetora do tipo Th1 contra a infecção por *L. amazonensis* em modelo murino.

Nossos resultados mostraram, ainda, que as células de baço dos animais imunizados produziram maiores níveis de GM-CSF, proteína relacionada com ativação de macrófagos e resistência a diferentes patógenos intracelulares. Foi demonstrado que esta citocina, em combinação com IFN- γ , é efetiva na inibição do parasita dentro da célula em modelo murino para *L. amazonensis* (HO et al., 1990), *L. major* (DUMAS et al., 2003; HURDAYAL, BROMBACHER, 2014) e *L. donovani* (MURRAY et al., 1995).

Nossos dados mostraram também que os animais imunizados apresentaram uma redução da carga parasitária em todos os órgãos (baço, linfonodo, fígado e medula óssea), além de uma diminuição da lesão da pata na qual os parasitas foram inoculados. Além disso, os dados revelaram a ocorrência de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK e p65/RelA.

Na leishmaniose tegumentar, a imunidade ao parasita é determinada por uma adequada resposta T auxiliar do tipo 1 (Th1), caracterizada por produção de IFN- γ , IL-12, TNF- α e, conseqüentemente, indução de óxido nítrico sintase tipo 2 (iNOS) em macrófagos infectados, os quais contribuem para controlar a multiplicação do parasita (COSTA et al, 2014). Por outro lado, a resposta do tipo Th2 apresenta altos níveis de IL-4 e IL-10, que reconhecidamente antagonizam a resposta Th1 em camundongos, conferindo suscetibilidade à doença (STÄGER et al., 2003; JOSHI et al., 2016). Nossos resultados em animais imunizados revelaram a capacidade do peptídeo mimético em induz uma resposta imune Th1, demonstrando que o peptídeo mimético é um excelente candidato vacinal.

Assim como neste trabalho, outros autores avaliaram potenciais candidatos para vacina contra *Leishmania*, e também obtiveram repostas predominantemente do tipo Th1 quando animais foram imunizados e desafiados com o parasita. Chávez-Fumagalli et al. (2010) observaram um aumento de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF e níveis reduzidos de IL-10 *in vitro* em esplenócitos de animais infectados por *L. infantum* e *L. amazonensis* e imunizados com uma proteína ribossomal extraída do parasita (LPR). Mais

recentemente, Martins et al. (2015) e Martins et al. (2016) testaram a imunogenicidade de proteínas hipotéticas de *Leishmania* e obtiveram respostas semelhantes a nossas.

A tecnologia do *Phage display* também pode ser usada na geração de anticorpos monoclonais, uma vez que fragmentos de anticorpos expressos na superfície de fagos possibilitam a seleção de sequências baseadas em sua afinidade de ligação a uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* (BARBAS et al., 2001; AZZAY E HICHSMITH, 2002). As bibliotecas de anticorpos são construídas no formato scFv, pois os fragmentos são estáveis, monoméricos e permitem uma rápida triagem baseada na afinidade do antígeno estudado (AZZAY E HICHSMITH, 2002).

Considerando que anticorpos capazes de reconhecer antígenos de superfície podem ser considerados como candidatos para efetores imunes e que antígenos contendo epítopos expostos são fortes candidatos para alvos vacinais (SEPULVEDA et al., 2010), no presente trabalho foram selecionados dois anticorpos (Fab) específicos a antígenos de superfície de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, e ambos demonstraram reatividade eficaz.

Com o objetivo de conhecer a proteína alvo de ligação dos anticorpos recombinantes selecionados por *Phage display*, foi realizada imunoprecipitação utilizando o extrato proteico (proteína na forma nativa), com a vantagem de isolar anticorpos contra epítopos nativos. Os dois Fab (2 F e 7H) selecionados de *L. amazonensis* apresentaram afinidade a uma proteína de aproximadamente 42 kDa e, os anticorpos de *L. infantum chagasi*, a uma proteína de 26 kDa.

A proteína antigênica gp42 faz parte de um grande número de proteínas ancoradas por glicosílios fatidilinositol presentes na membrana das formas promastigotas. Está envolvida na resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, pois induz alta resposta proliferativa, de tal forma que testes de vacinação em associação com outras proteínas de superfície do parasita, resultaram em uma significativa inibição do desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c suscetíveis desafiados com *L. major* (MCCONVILLE et al., 2002; TONUI et. al, 2004; OLIVEIRA et al., 2011).

Apesar da proteína com tamanho aproximadamente de 26 kDa se mostrar antigênica, a mesma consta no banco de dados de *L. infantum* como proteína hipotética. Pouco se sabe sobre boa parte destas proteínas, desde características estruturais até sua função e localização celular ou descrição de regiões antigênicas, mas vários antígenos repetitivos de diferentes massas moleculares têm sido investigados com a finalidade de

aprimorar os testes sorológicos e vacinais (BHATIA et al., 1999; GOTO et al., 2010; KRINGELUM et al., 2012; MATRANGOLO et al., 2013).

A descoberta de peptídeos que sejam epítomos com potencial diagnóstico, terapêutico e vacinal tem respondido positivamente às críticas levantadas contra o uso de antígenos recombinantes. Soma-se a isso o fato destes serem produzidos de forma mais barata e com alta qualidade, além de serem facilmente controlados quimicamente para o uso em ensaio imunoenzimático e/ou outras reações sorológicas.

8. CONCLUSÃO

Os peptídeos miméticos avaliados neste trabalho mostraram alto desempenho para o diagnóstico de leishmaniose humana, com amplo poder de detecção de IgG circulantes em soros de pacientes infectados tanto com *L. brasiliensis* quanto *L. infantum chagasi*, isoladamente, ou em coinfeção com HIV. Os peptídeos apresentaram sensibilidade e especificidade maior que o método atualmente empregado no diagnóstico sorológico das leishmanioses, o qual utiliza extrato proteico total do parasita. Além disso, os peptídeos sintéticos se mostraram promissores para detecção da infecção em saliva, o que é um procedimento inovador por introduzir, nesta ferramenta diagnóstica, características essenciais para sua utilização como método diagnóstico de rotina, tais como utilização em amostra menos invasiva, facilitando a coleta e transporte do material e, conseqüentemente, maior acesso desta nova tecnologia na prática clínica, sobretudo em regiões endêmicas, nas quais as condições de infraestrutura e acesso ao serviço de saúde são precários.

Na perspectiva vacinal, os peptídeos recombinantes foram capazes de reduzir a invasão dos parasitas nos macrófagos e de impedir a reprodução destes *in vitro*. Esses resultados sustentaram a investigação em sistema *in vivo*, cujos resultados mostraram que o peptídeo mimético tem a capacidade de induzir a resposta imune do tipo Th1, potencializando a resposta imune contra *L. amazonensis*.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os peptídeos miméticos LC1 e LC2 serão testados em camundongos BALB/c para avaliar o potencial protetor contra *L. infantum chagasi*, os peptídeos serão testados

em combinações para aumentar a eficiência da vacina e identificar as proteínas através da espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, P.; SILVEIRA, H. Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, v. 27, n. 2, p. 71-86, 2009.

AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, v. 22, n. 5, p. 1304 - 1309, 2007.

ANDRADE, B. B.; BOAVENTURA, V.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Métodos de diagnóstico da leishmaniose tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. *Gazeta Médica da Bahia*, v.75, n. 1, p. 75-82, 2005.

ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A. S. C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H.N. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*; v. 17, n. 2, p. 107-116, 2008.

ATTA, A. M.; COLOSSI, R.; SOUSA-ATTA, JERONIMO, M. L. B., NASCIMENTO, D. S. B.; BEZERRA, G. F.; ORGE, G.; CARVALHO, E. M. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 5, p. 525-530, 2004.

AZZAZY, H. M. E.; HICHSMITH JR., W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, v. 35, n. 6, p. 425-445, 2002.

BAHARIA, R. K.; TANDON, R.; SHARMA, T.; SUTHAR, M. K.; DAS, S.; SIDDIQI, M. I.; SAXENA, J. K.; SUNDAR, S.; DUBE, A. Recombinant NAD-dependent SIR-2 protein of *Leishmania donovani*: immunobiochemical characterization as a potential vaccine against visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. v. 9, p. e0003742, 2015.

BAILEY M. S., LOCKWOOD D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n.2, p. 203-211, 2007.

BANU, S. S.; MEYER, W.; AHMED, B. N.; KIM, R.; LEE, R. Detection of *Leishmania donovani* in peripheral blood of asymptomatic individuals in contact with patients with visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* v. 110, n. 5, p. 286-293, 2016.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology*, v. 64, p. 1-109, 2007.

BARBAS, C.F.III; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=V7bwAAAAMAAJ>>.

BEAUMIER, C. M.; GILLESPIE, P. M.; HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Translational Research*, v. 162, n. 3, p. 144-155, 2013.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 19, p. 1-33, 2001.

BHATIA, A.; DAIFALLA, N. S.; JEN, S.; BADARO, R.; REED, S. G.; SKEIKY, Y. A. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 102: 249-261, 1999.

BHATTACHARYYA, T.; BOWES, D.; EL-SAFI, S.; SUNDAR, S.; FALCONAR, A. K.; SINGH, O. P.; KUMAR, R.; AHMED, O.; BOELAERT, M.; MILES, M. A. Significantly lower anti-*Leishmania* IgG responses in Sudanese versus Indian visceral leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 2, p. e2675, 2014.

BOELAERT M, VERDONCK K, MENTEN J, SUNYOTO T, VAN GRIENSVEN J, CHAPPUIS F. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 1, p. 32-40, 2008.

BOELAERT, M.; VERDONCK, K.; MENTEN, J.; SUNYOTO, T.; VAN GRIENSVEN, J.; CHAPPUIS, F.; RIJAL, S. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 6, 2014.

BOGGILD, A. K.; VALENCIA, B. M.; VELAND, N.; PILAR RAMOS, A.; CALDERON, F.; AREVALO, J.; LOW DE, LLANOS-CUENTAS A. Non-invasive cytology brush PCR diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: superior performance to conventional biopsy with histopathology. *PLoS One*, v. 6, n.10, p. e26395, 2011.

BORRA, R. C.; LOTUFO, M. A.; GAGIOTI, S. M.; BARROS, F. M.; ANDRADE, P. M. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Brazilian Oral Research*, v. 23, n. 3, p. 255-262, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Normas e Manuais Técnicos. Editora MS, 2ª edição atualizada, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. *Sistema de Informação de Agravos de Notificação*. Serviço de Vigilância em Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf. Último acesso em: 31/10/2015.

BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; REED, S. G.; JERONIMO, S. M. The sensitivity and specificity of *Leishmania* chagasi recombinant K39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, n. 4, p. 344-348, 2002.

BRETON, M.; TREMBLAY, M. J.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 6372-6382, 2005.

CABALLERO, Z. C.; SOUSA, O. E.; MARQUES, W. P.; SAES-ALQUEZAR, A.; UMEZAWA, E. S. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, p. 1045-1049, 2007.

CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; SOTO, M.; FRESNO, M.; REQUENA, J. M. *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: preliminary evaluation. *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 150, p. 4-10, 2011.

CARVALHO, S. F. G.; LEMOS, E. M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.68, p. 321-324, 2003.

CHAN, C. E.; LIM, A. P.; MACARY, P. A.; HANSON, B. J. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *International Immunology*, v. 26, p. 649-657, 2014.

CHAPPUIS, F.; RIJAL, S.; SINGH, R.; ACHARYA, P.; KARKI, B. M.; DAS, M. L.; BOVIER, P. A.; DESJEUX, P.; LE RAY, D.; KOIRALA, S.; LOUTAN, L. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Tropical Medicine and International Health*, v. 8, n. 3, p. 277-85, 2003.

CHAPPUIS, F.; RIJAL, S.; SOTO, A.; MENTEN, J.; BOELAERT, M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*, v. 333, p. 723, 2006.

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

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; COSTA, M. A. F.; OLIVEIRA, D. M.; RAMÍREZ, L.; COSTA, L. E.; DUARTE, M. C.; MARTINS, V. T.; OLIVEIRA, J. S.; OLORTEGI, C. C.; BONAY, P.; ALONSO, C.; TAVARES, C. A. P.; SOTO, M.; COELHO, E.A.F. Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. *Microbes and Infection*, v. 1, n. 11, p. 2-11, 2010.

COELHO, E. A. F.; RAMÍREZ, L.; COSTA, M. A. F.; COELHO, V. T. S.; MARTINS, V. T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; OLIVEIRA, D. M.; TAVARES, C. A. P.; BONAY, P.; NIETO, C. G.; ABÁNADES, D. R.; ALONSO, C.; SOTO M. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 16, p. 1774-1780, 2009.

COELHO, V. T. S.; OLIVEIRA, J. S.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; DUARTE, M. C.; LAGE, P. S.; SOTO, M. SANTORO, M. M.; TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; COELHO, E. A. F. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, p. e1430, 2012.

COLER, R. N.; DUTHIE, M. S.; HOFMEYER, K. A.; GUDERIAN, J.; JAYASHANKAR, VERGARA, L. J.; ROLF, T.; MISQUITH, A.; LAURANCE, J. D.; RAMAN, V. S.; BAILOR, H. R.; CAUWELAERT, N. D.; REED, S. J.; VALLUR, A.; FAVILA, M.; ORR, M. T.; ASHMAN, J.; GHOSH, P.; MONDAL, D.; REED, S. G. From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3 + GLA-SE. *Clinical Translational Immunology*, v. 4, p. e35, 2015.

COSTA C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

COSTA, C. H.; STEWART, J. M.; GOMES, R. B.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K.; BOZZA, M.; SATOSKAR, A.; DISSANAYAKE, S.; SANTOS, R. S.; SILVA, M. R.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 4, p. 334-337, 2002.

COSTA, L. E.; LIMA, M. I.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; MENEZES-SOUZA, D.; MARTINS, V. T.; DUARTE, M. C.; LAGE, P. S.; LOPES, E. G.; LAGE, D. P.; RIBEIRO, T. G.; ANDRADE, P. H.; DE MAGALHÃES-SOARES, D. F.; SOTO, M.; TAVARES, C. A.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 21, p. 96-106, 2014.

COSTA, M. M.; PENIDO, M.; SANTOS, M. S. DORO, D.; FREITAS, E.; MICHALICK, S. M.; GRIMALDI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations

of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 5, p. e1622, 2012.

COTA, G. F. E. A.; DE SOUSA, M. R.; DE FREITAS, N. B. M.; GOMES, L. I.; OLIVEIRA, E.; ASSIS, T. S.; DE MENDONÇA, A. L.; PINTO, B. F.; SALIBA, J. W.; RABELLO, A. Comparison of parasitological, serological e molecular tests for visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients: a cross-sectional delayed-type study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, n. 3, p. 570-577, 2013.

COTA, G. F.; DE SOUSA, M. R.; DE MENDONÇA, A. L.; PATROCINIO, A.; ASSUNÇÃO, L.S.; DE FARIA, S. R.; RABELLO, A. Leishmania HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 4, p. e2816, 2014.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 72, p. 132-141, 2002.

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. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, n. 10, p. 1312-1319, 2012.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Revista de Saúde Pública*, v. 40, n. 3, p. 537-541, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALEGO, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; OTRANTO, D. Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; MORAIS, R. C. S.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L. A. M.; GONÇALVES DE ALBUQUERQUE, S. C.; TAVARES, D. H. C.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C.; SILVA RDE, F.; PEREIRA, V. R. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & Bioscience*, v. 5, n. 31, p. 2-10, 2015.

DENIAU, M.; CAÑAVATE, C.; FARAUT-GAMBARELLI, F.; MARTY, P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 97, p. 115-133, 2003.

DERMINE, J. F.; GOYETTE, G.; HOUDE, M.; TURCO, S.J.; DES-JARDINS, M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiology*, v. 7, p. 1263-1270, 2005.

DEY, A.; KUMAR, U.; SHARMA, P.; SINGH, S. Immunogenicity of candidate chimeric DNA vaccine against tuberculosis and leishmaniasis. *Vaccine*, v. 27, p. 5152-5160, 2009.

DUMAS, C.; MUYOMBWE, A.; MATTE, C.; OUELLETTE, M.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B. Recombinant *Leishmania major* Secreting Biologically Active Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Survives Poorly in Macrophages In Vitro and Delays Disease Development in Mice. *Infection and immunity*, v. 71, n. 11, p. 6499-6509, 2003.

DUMONTEIL, E. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2007, n. 6, p. 905-920, 2007.

DUTHIE, M. S.; RAMAN, V. S.; PIAZZA, F. M.; REED, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine*, v. 30, p. 134-141, 2012.

ELMAHALLAWY, E. K.; MARTÍNEZ, A. S.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y.; AHMAD, A.; MARI, J. M. N.; FERNÁNDEZ, J. G. Diagnosis of Leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 8, p.961-972, 2014.

FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M. H.; HATAM, G. R.; ASGARI, Q.; KALANTARI, M.; MOHEBALI, M. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 102, n. 7, p. 577-583, 2008.

FARIAS, L. H. S.; RODRIGUES, A. P.; SILVEIRA, F. T.; SEABRA, S. H.; DAMATTA, R. A.; SARAIVA, E. M.; SILVA, E. O. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 207, n. 3, p. 537-43, 2013.

FILARDY, A. A.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; KOELLER, C. M.; GUIMARÃES, K. P.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; LOPES, M.; HEISE, N.; FREIRE-DE-LIMA, C.; NUNES, M. P.; DOS REIS, G. A. Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. *Plos One*, v. 9, n. 1, p. e85715, 2014.

FUKUNAGA K, TAKI M. Practical tips for construction of custom Peptide libraries and affinity selection by using commercially available phage display cloning systems. *Journal of Nucleic Acids*, v. 2012, n. 1-10, 2012.

FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium species*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

GARCIA, C. R. S.; AZEVEDO, M. F.; WUNDERLICH, G.; BUDU, A.; YOUNG, J.; BANNISTER, L. Plasmodium in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 266, p. 85- 156, 2008.

GILLESPIE, P. M.; BEAUMIER, C. M.; STRYCH, U.; HAYWARD, T.; HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, 2016.

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; ANDRADE, L. R.; DIETZE, R.; LEMOS, E.; BELLI, A.; JÚNIOR, S. F.; FERREIRA, M. S. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p.135-141, 2008.

GONTIJO, B. E DE CARVALHO, L. B. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, 2004.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J. A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2, 2009.

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

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L.; POSADA-VERGARA, M. P.; BARBOSA, R. N.; CELESTE, B. J.; COSTA, C. H. N. HIV-Leishmania coinfection in Brazil: Serological tests for diagnosis of leishmaniasis. Abstract book, III WorldLeish, Italy. 2005; 145.

GOULART, L. R.; VIEIRA, C. U.; FRESCHI, A. P.; CAPPARELLI, F. E.; FUJIMURA, P. T.; ALMEIDA, J. F.; FERREIRA, L. F.; GOULART, I. M.; BRITOMADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. *Critical Reviews in Immunology*, v. 30, p. 201-222, 2010.

GUERRA, J. A. O.; RIBEIRO, J. A. S.; COELHO, L. I. A. R. C.; BARBOSA, M. G. V.; PAES, G. P. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 22, p. 2319-27, 2006.

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

HAMID, R.; ROTSHEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro*, v. 18, n. 5, p. 703-710, 2004.

HELL, R. C.; AMIM, P.; DE ANDRADE, H. M.; DE AVILA, R. A.; FELICORI, L.; OLIVEIRA, A. G.; OLIVEIRA, C. A.; NASCIMENTO, E.; TAVARES, C. A.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Immunodiagnosis of human

neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. *Clinical Immunological*, v. 131, n. 1, p. 129-138, 2009.

HEMMINGA, M. A.; VOS, W. L.; NAZAROV, P. V.; KOEHORST, R. B.; WOLFS, C. J.; SPRUIJT, R. B.; STOPAR, D. Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages. *European Biophysics Journal*, v. 39, n. 4, p. 541-550, 2010.

HIDE, M.; MARION, E.; POMARES, C.; FISA, R.; MARTY, P.; BAÑULS, A. L. Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. *International Journal for Parasitology*, v. 43, n. 5, p. 389-397, 2013.

HO, J. L.; REED, S. G.; WICK, E. A.; GIORDANO, M. Granulocyte-macrophage and macrophage colony-stimulating factors activate intramacrophage killing of *Leishmania mexicana amazonensis*. *The Journal of infectious diseases*, v. 162, p. 224-230, 1990.

HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. *Immunology Letters*, v. 161, p. 179-183, 2014.

IBORRA, S.; PARODY, N.; ABÁNADES, D. R.; BONAY, P.; PRATES, D., NOVAIS, F. O.; BARRAL-NETTO, M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes and Infection*. v. 10, p. 1133-1141, 2008.

JONES, C.; GRAINGER, D. W. *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, n. 6, p. 438-456, 2009.

JOSHI, P. B.; KELLY, B. L.; KAMHAWI, S.; SACKS, D. L.; MCMASTER, W. R. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.120, p. 33-40, 2002.

JOSHI, P. B.; YADAV, N. K.; RAWAT, K.; TRIPATHI, C. D. P.; JAISWAL, A. K.; KHARE, P.; TANDON, R.; BAHARIA, R. K.; DAS, S.; GUPTA, R.; KUSHAWAHA, P.; SUNDAR, S.; SAHASRABUDDHE, A. A.; DUBE, A. Comparative Analysis of Cellular Immune Responses in Treated *Leishmania* Patients and Hamsters against Recombinant Th1 Stimulatory Proteins of *Leishmania donovani*. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. 302, p. 1-8, 2016.

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

KEHOE, J. W.; KAY, B. K. Filamentous phage display in the new millennium. *Chemical Reviews*, v. 105, n. 11, p. 4056-4072, 2005.

KHAMESIPOUR, A. Therapeutic vaccines for leishmaniasis. *Expert Opinion on Biological Therapy*. v. 14, n. 11, p. 1641-1649, 2014.

KRINGELUM, J. V.; LUNDEGAARD, C.; LUND, O.; NIELSEN, M. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLOS Computational Biology*, v. 8, n. 12, p. e1002829, 2012.

KUMAR, A.; SAMANT, M. DNA vaccine against visceral leishmaniasis: a promising approach for prevention and control. *Parasite Immunology*, v. 38, p. 273-281, 2016.

KUMAR, R.; PAI, K.; PATHAK, K.; SUNDAR, S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, p. 1220-1224, 2001.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.1, n.2, p.13-32, 2010.

LAWRENCE, H. P. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *Journal Canadian Dental Association*, v. 68, n. 3, p. 170-174, 2002.

LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, N.; MURRAY, A.; MCMASTER, W. R. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The leishmania genome is constitutively expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 152, n. 1, p. 35-46, 2007.

LEMOS, E. M.; CARVALHO, S. F. G.; COREY, R.; DIETZE, R. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante k39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, 2003.

LEVISSON, M.; SPRUIJT, R. B.; WINKEL, IN; KENGEN, S. W.; VAN DER OOST J. Phage display of engineered binding proteins. *Methods in Molecular Biology*, v., 1129, p. 211-229, 2014.

LOCKWOOD, D. N. J. E SUNDAR, S. Serological tests for visceral leishmaniasis. *BMJ*, v. 333, n. 7571, p. 711-712, 2006.

LODGE, D. M.; WILLIAMS, S.; MACLSAAC, H. J.; HAYES, K. R.; LEUNG, B.; REICHARD, S.; MACK, R. N.; MOYLE, P. B.; SMITH, M.; ANDOW, D. A.; CARLTON, J. T.; MCMICHAEL, A. Biological invasions: recommendations for US policy and management. *Ecological Applications*, v. 6, n. 6, p. 2035-2054, 2006.

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

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L. DE SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil : trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MANSUETO, P.; SEIDITA, A.; VITALE, G.; CASCIO, A. Leishmaniasis in travelers: A literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 12, p. 563-581, 2014.

MARANHÃO. Secretaria de Estado da Saúde. Secretaria Adjunta Assistência à saúde. *Boletim Epidemiológico/SINAN-Programa Estadual de DST/Aids*. São Luís: Secretaria de Estado da Saúde; 2009.

MARCILI, A.; SPERANÇA, M. A.; DA COSTA, A. P.; MADEIRA, M. D. E. F.; SOARES, H.S.; SANCHES, C. D. E. O.; ACOSTA, I. D. A. C.; GIROTTO, A.; MINERVINO, A. H.; HORTA, M. C.; SHAW, J. J.; GENNARI, S. M. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 25, p.44-51, 2014.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; PINEDA, J. A.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; GARCÍA-GARCÍA, J.; ACEDO, C.; MACÍAS J. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, n. 5, p. 545-548, 2004.

MARTINS, V. T.; LAGE, D. P.; DUARTE, M. C.; COSTA, L. E.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; ROATT, B. M.; MENEZES-SOUZA, D.; TAVARES, C. A.; COELHO, E. A. Cross-protective efficacy from a immunogen firstly identified in *Leishmania infantum* against tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v, 38, n. 2, p. 108-117, 2016.

MARTINS, V. T.; LAGE, D. P.; DUARTE, M. C.; COSTA, L. E.; GARDE, E.; RODRIGUES, M. R.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; TAVARES, C. A.; SOTO, M.; COELHO, E. A. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein, LiHyT, used as a vaccine antigen against visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 154, p. 73-81, 2015.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, 2004.

MASIH, S.; ARORA, S. K.; VASISHTA, R. K. Efficacy of *Leishmania donovani* ribosomal P1 gene as DNA vaccine in experimental visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v. 129, p. 55-64, 2011.

MATLASHEWSKI, G.; DAS, ; PANDEY; K.; SIGH, D.; DAS, S.; GHOSH, A. K.; PANDEY,R. N.; DAS, V. N. R. Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Bihar India: Comparison of the rK39 Rapid Diagnostic Test on Whole Blood Versus Serum. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 5, p. e2233, 2013.

MATLASHEWSKI, G.; ARANA, B.; KROEGER, A.; BATTACHARYA, S.; SUNDAR, S.; DAS, P.; SINHA, P. K.; RIJAL, S.; MONDAL, D.; ZILBERSTEIN, D.; ALVAR, J. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, n. 4, 2011.

MATOS, H. J.; PINTO, A. Y. N.; MIRANDA, A. M. M.; SILVA, F. L. C.; RAMOS, F. L. P. Cross-reactivity in serological tests between Chagas disease and visceral leishmaniasis in endemic regions for both diseases. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 6, n.1, 2015.

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

MCCONVILLE, M.; MULLIN, K. A.; ILGOUTZ, S.; TEASDALE, R. D. Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 1, p. 122-154, 2002.

MILES, S. A.; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, n. 5, p. 747-754, 2005.

MONTALVO, A. M.; FRAGA, J.; MONZOTE, C. L.; GARCIA, G.; FONSECA, L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, v. 64, n. 2, p. 108- 131, 2012.

MORTARINO, M.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCCHI, C.; GENCHI, C.; BANDI, C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parassitologia*, v. 46, n.1-2, p. 163-167, 2004.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunological Reviews*, v. 240, p. 286-296, 2011.

MOURA, A. S.; LOPES, H. M. R. O. ; MOURÃO, M. V.; A.; MORAIS, M. H. F. Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 46, n. 5, p. 589-593, 2013.

MUELLER, Y. K.; KOLACZINSKI, J. H.; KOECH, T.; LOKWANG, P.; RIONGOITA, M.; VELILLA, E.; BROOKER, S. J.; CHAPPUIS, F. Clinical epidemiology, diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis in the Pokot endemic area of Uganda and Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, n. 1, p. 33-9, 2014.

MURRAY, H. W.; CERVIA, J. S.; HARIPRASHAD, J.; TAYLOR, A. P.; STOECKLE, M. Y.; HOCKMAN, H. Effect of granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of clinical investigation*, v. 95, n. 3, p. 1183-1192, 1995.

MURRAY, H. W.; LU, C. M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R. L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infection and Immunity*. v. 70, p. 6284-6293, 2002.

MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 8, p. 4916-4923, 2005.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiology*, v.10, p. 301-308, 2008.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. *International Immunopharmacology*, v. 11, p. 1464-1488, 2011.

NASCIMENTO, M. D.; BEZERRA, G. F. B.; NETO Bandeira, A. P.; SIVA, L. M.; BEZERRA, J. M.; VIANA, G. M. C. Estudo comparativo de anticorpos IgG e IgE antileishmania como marcadores de infecção e doença em indivíduos de área endêmica de leishmaniose visceral, em São Luis, MA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, p. 39-41, 2006.

NEITZKE-ABREU, H. C.; VENZAZZI, M. S.; BERNAL, M. V.; REINHOLD-CASTRO, K. R.; VAGETTI, F.; MOTA, C. A.; SILVA, N. R.; ARISTIDES, S. M. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Detection of DNA from *Leishmania (Viannia)*: accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*, v. 5, n. 8, p. e62473, 2013.

NEW ENGLAND BIOLABS LIBRARIES. Applications of the Ph.D. Phage display peptide libraries: catálogo. [Ipswich, MA]: New England Libraries, [2016]. 1p. Catálogo de técnicas.

NICO, D.; GOMES, D. C.; PALATNIK-DE-SOUSA, I.; MORROT, A.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase terminal domains in cross-protective immunotherapy against *Leishmania amazonensis* murine infection. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. 273. 2014.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 5, p. 1666-1669, 2002.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OLEKHNOVITCH, R. E. BUSSO, P. Induction, propagation and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection. *Trends in Parasitology*, v. 32, n.12, p. 653-664, 2015.

OLEKHNOVITCH, R.; RYFFEL, B.; MÜLLER, A. J.; BUSSO, P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n.4, 2014.

OLIVEIRA, G. G.; MAGALHÃES, F. B.; TEIXEIRA, M. C.; PEREIRA, A. M.; PINHEIRO, C. G.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, M. B.; BEDOR, C. N.; ALBUQUERQUE, A. L.; DOS-SANTOS, W. L.; GOMES, Y. M.; MOREIRA, E. D. JR; BRITO, M. E; PONTES DE CARVALHO L. C.; DE MELO NETO, O. P. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 6, 2011.

OLIVEIRA, G. M. G.; FILHO FIGUEIRÓ, E. A.; ANDRADE, G. M. C.; ARAÚJO, L. A.; OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, R. V. Survey of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Três Lagoas municipality, Mato Grosso do Sul, State, Brazil na área of intense transmission of American visceral leishmaniasis. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 3, p. 83-95, 2010.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 6, p. 2006.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 69, n. 1 p. S10-S18, 2014.

PARMLEY, S.F., SMITH, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v.73, p.305-318, 1988.

PEDRAS, M. J.; ORSINIA, M., CASTRO, M.; PASSOS, V. M. A.; RABELLO, A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.47, n.3, p. 477-485, 2003.

PEDRAS, M. J.; VIANA, L. G.; OLIVEIRA, E. J.; DE RABELLO A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, p.172-178, 2008.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiology*, v. 11, n. 9, p. 1290-1296, 2009.

PHUMEE, A.; KRAIVICHIAN, K.; CHUSRI, S.; NOPPAKUN, N.; VIBHAGOOOL, A.; SANPRASERT, V.; TAMPANYA, V.; WILDE, H.; SIRIYASATIEN, P. *Detection of*

of *Leishmania siamensis* DNA in saliva by polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, n. 5, p. 899-905, 2013.

PINHEIRO, F. G.; FREITAS, R. A.; ROCHA, L. C.; FRANCO, A. M. R. Primeiro registro de *Lutzomyia (Trichopygomya) convicti* Ramirez Perez, Martins & Ramirez (Diptera: Psychodidae) no Brasil. *Neotropical Entomology*, v. 39, p. 676-677, 2010.

PLOSS, M.; FACEY, S. J.; BRUHN, C.; ZEMEL, L.; HOFMANN, K.; STARK, R. W.; ALBERT, B.; HAUER, B. Selection of peptides binding to metallic borides by screening M13 phage display libraries. *BMC Biotechnology*, v. 14, n. 12, p. 1-11, 2014.

POURMOHAMMADI, B.; MOTAZEDIAN, M. H.; HATAM, G. R.; KALANTARI, M.; HABIBI, P.; SARKARI, B. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Iranian Journal of Parasitology*, v.5, n.4, p.1-8, 2010.

QUARESMA, P. F.; RÊGO, F. D.; BOTELHO, H. A.; DA SILVA, S. R.; JÚNIOR MOURA, A. J.; NETO TEIXEIRA, R. G.; MADEIRA, F. M.; CARVALHO, M. B.; PAGLIA, A. P.; MELO, M. M.; GONTIJO, C. M. F. F. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, p. 579-585, 2011.

RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 97, n. 1; p.17-28, 2003.

RAFATI, S.; ZAHEDIFARD, F.; NAZGOUEE, F. "Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis". *Vaccine*, vol. 24, n. 12, p. 2169-2175, 2006.

RAMALHO-ORTIGAO, M.; SARAIVA, E.; TRAUB-CSEKÖ, Y. M. Sandy fly-Leishmania interactions: relationships are not necessarily easy. *The Open Parasitology Journal*, v.1, n.4, p. 195-204, 2010.

RAMAN, V. S.; DUTHIE, M. S.; FOX, C. B.; MATLASHEWSKI, G.; REED, S. G. Adjuvants for Leishmania vaccines: from models to clinical application. *Frontiers Immunology*, v. 3, p. 144, 2012.

RAMÍREZ, L.; SANTOS, D. M.; SOUZA, A. P.; COELHO, E. A.; BARRAL, A.; ALONSO, C.; ESCUTIA, M. R.; BONAY, P.; OLIVEIRA, C. I.; SOTO, M. Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the *Leishmania major* recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, v. 3, p. 1312-1319, 2013.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, v. 12, p. 12347-12360, 2012.

RASMUSSEN, B.; DESCOTEAUX, A. Contribution of Electron and confocal microscopy in the study of *Leishmania*-macrophage interactions. *Microscopy and Microanalysis*, v.10, p. 656-661, 2004.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Reviews of Entomology*, v. 58, p. 227–250, 2013.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 3, n. 6, p. 147-154, 2014.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, v. 15, p. 41-51, 2010.

REITER-OWONA, I.; REHKAEMPER-SCHAEFER, C.; ARRIENS, S.; ROSENSTOCK, P.; PFARR, K.; HOERAUF, A. Specific K39 antibody response and its persistence after treatment in patients with imported leishmaniasis. *Parasitology Research*, p. 1-9, 2015.

RHAIEM, R. B.; HOUIMEL, M. Targeting *Leishmania* major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. *Acta Tropica*, v. 159, p. 11-19, 2016.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A.L.; BENINK, A. H. WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; NELSON, H.; ARKIN, M.; AULD, D.; AUSTIN, C.; BEJCEK, B.; GLICKSMAN, M.; INGLESE, J.; IVERSEN, P. W.; LI, Z.; MCGEE, J.; MCMANUS, O.; MINOR, L.; NAPPER, A.; PELTIER, J. M.; RISS, T.; TRASK JR, O. J.; WEIDNER, J. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda MD: Advancing Translational Sciences, 2015, p.1-23.

RITMEIJER, K.; MELAKU, Y.; MUELLER, M.; KIPNGETICH, S.; O'KEEFFE, C.; DAVIDSON, R. N. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, n. 1, p. 76-80, 2006.

ROBINSON, J. M.; OHIRA T.; BADWEY J. A. Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 122, p. 293-304, 2004.

RODRÍGUEZ, N. Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación com el desarrollo de la leishmaniasis. *Dermatología Venezolana*, v.41, p. 3-9, 2003.

SAMPAIO, R. N. R.; GONÇALVES, M. C.; LEITE, V. A.; FRANÇA, B. V.; SANTOS, G.; CARVALHO, M. S. L.; TAUIL, P. L. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n.6, p.686-690, 2009.

SARDAR, A. H.; SUDEEP, K.; ASHISH, K.; BIDYUT, P.; SUSHMITA, D.; ABHIK S.; MANISH, K.; KISLAY, K. S.; DHARMENDRA, S.; ASIF, E.; VAHAB, A.;

PRADEEP, D. Proteome changes associated with *Leishmania donovani* promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. *Journal of Proteomics*, v. 81, p.185-199, 2013.

SEPULVEDA, J., TREMBLAY J.M., DEGNORE, J.P., SKELLY, P.J., SHOEMAKER, C.B., 2010. *Schistosoma mansoni* host-exposed surface antigens characterized by sera and recombinant antibodies from schistosomiasis-resistant rats. *International Journal for Parasitology*, v. 40, 1407-1417, 2010.

SHARMA, A.; SAHA, A.; BHATTACHA, R. J. E. E. S.; MAJUMDAR, S., GUPTA, S. K. Specific and Randomly Derived Immunoactive Peptide Mimotopes of Mycobacterial Antigens. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, n. 10, p. 1143 - 1154, 2006.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 47, n. 6, p. 412-423, 2009.

SILVA, D. F.; FREITAS, R. A.; FRANCO, A. M. R. Diversidade e Abundância de Flebotomíneos do Gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em Áreas de Mata do Nordeste de Manacapuru, AM. *Neotropical Entomology*, v. 36, p. 138-144, 2007.

SILVA, J. G. L.; SILVA, T. M.; PELOSO, E. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; MAYRINK, W.; ARIOSIA, M. C. F.; SILVA, P. M. F.; MARQUES, M. J. Comparison among three Polymerase Chain Reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with american cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.45, n.2, p.257-259, 2012.

SILVA, M. A. L.; ACIOLI, R.; Medeiros, S. B.; MELO, F. L.; MEDEIROS, Z., Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 1, p. 1-15, 2010.

SILVESTRE R, CORDEIRO-DA-SILVA A, OUAISSI A. Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 56, p. 123-126, 2008.

SINGH, A.; RAMESH, V. Histopathological features in leprosy, post-kala-azar dermal leishmaniasis, and cutaneous leishmaniasis. *Indian Journal Dermatology Venereology and Leprology*, v.79, p. 360-366, 2013.

SINGH, D.; PANDEY, K.; DAS, V. N.; DAS, S.; KUMAR, S.; TOPNO, R. K.; DAS, P. Novel noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by rK39 testing of sputum samples. *Journal Clinical Microbiology*, v. 47, p. 2684-2685, 2009.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

SOUSA-GOMES, M. L.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; PELISSARI, D. M.; LIMA, JUNIOR F. E. F.; SENA, J. M.; CECHINEL, M. P. Co- infecção *Leishmania*-HIV no

Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 20, n. 4, p. 519-526, 2011.

SOUSA, L. P.; LOPES, F.; SILVA, D. M.; TAVARES, L. P.; VIEIRA, A. T. REZENDE, B. M.; CARMO, A. F.; RUSSO, R. C.; GARCIA, C. C. BONJARDIM, C. A.; ALESSANDRI, A. L.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 87, n. 5, p. 895-904, 2010.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.105, p. 1-6, 2010.

SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SIGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 9, p. 277, 2016.

STÄGER, S.; SMITH, D.F.; KAYE, P. M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 165, p. 7064-7071, 2000.

STÄGER, S.; ALEXANDER, J.; CARTER, K. C.; BROMBACHER, F.; KAYE, P. M. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infection and Immunity*, v. 71, p. 4804 - 4807, 2003.

STOBIE, L.; GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D. L.; GLAICHENHAUS, N.; CHANG-YOU, W.; SEDER, R. A. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 8427-8432, 2000.

STODDART, M. J. Mammalian cell viability: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*, v.70, p.103-122, 2010.

SUNDAR, S. Diagnosis of kala-azar – an important stride. *Journal Association of Physicians of India*, v. 51, p. 753-754, 2003.

SUNDAR, S.; PAI, K.; SAHU, M.; KUMAR, V.; MURRAY, W. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 96, p. 19-23, 2002.

SUNDAR, S.; SINGH, R. K.; MAURYA, R.; KUMAR, B.; CHHABRA, A.; SINGH, V.; RAI, M. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.100, p. 533-537, 2006.

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

SZARDENINGS, M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, v. 23, n. 4, p. 307-49, 2003.

TANAKA, A. K.; GORIN, P. A. J.; STRAUS, A. H. Role of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.40, p. 799-806, 2007.

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

TER, H. R.; TEFERA, T.; ASSEFA, G. EBRAHIM, A. Z.; DAVIDSON, R. N.; RITMEIJER, K. Field evaluation of rK39 test and direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis in a population with high prevalence of human immunodeficiency virus in Ethiopia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, p. 929-934, 2009.

TOLEDO, V. P. C. P.; MAYRINK, W.; GOLLOB, K. J.; OLIVEIRA, M. A. P.; DA COSTA, C. A.; GENRAO, O. PINTO, J.A.; AFONSO, L. C.C. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 1, p.89-98, 2001.

TONUI, W. K.; MEJIA, J. S.; HOCHBERG, L.; MBOW, M. L.; RYAN, J. R.; CHAN, A. S.; MARTIN, S. K.; TITUS, R. G. Immunization with *Leishmania major* exogenous antigens protects susceptible BALB/c mice against challenge infection with *L. major*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 10, p. 5654-5661, 2004.

TRINDADE, M. A. B.; SILVA, L. L. C; BRAZ, L. M. A.; AMATO, V. S. L.; NAAFS, B.; SOTTO, M. N. Post-kala-azar dermal leishmaniasis and leprosy: case report and literature review. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, n. 543, p. 5 -8, 2015.

TRIPATHI, A.; GUPTA C. M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotas. *Molecular and Biochemical Parasitology*, n. 128, p. 1-9, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Imunoscan Engenharia Molecular Ltda-ME. (Uberlândia, MG). Ana Graci Brito Madurro. Peptídeos recombinantes e motivos proteicos miméticos a antígenos de leishmania e suas aplicações. BR. N. PI0903089-1, 12 de ag. de 2008, 12 de abril de 2011.

VAISH, M.; SINGH, O. P.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. rK39 antigen for the diagnosis of visceral leishmaniasis by using human saliva *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.86, n. 4, p. 598-600, 2012.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, p. 337-351, 2011.

VIEIRA, L. Q.; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M.; PFEFFER, K.; MAK, T. SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *Journal of immunology*, v. 157, p. 827-835, 1996.

WANDERLEY, J. L. M.; MOREIRA, M. E. C.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *The Journal of Immunology*, v. 176, p. 1834-1839, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Control of the Leishmaniasis. Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso 20 maio 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Leishmaniasis. Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso 20 maio 2016.

WU, J.; PARK, J. P.; DOOLEY, K.; CROPEK, D. M.; WEST, A. C.; BANTA, S. Rapid development of new protein biosensors utilizing peptides obtained via phage display. *PloS One*, v. 6, n.10, p. e24948, 2011.

ZANCONATO, S.; MINERVINI, G.; POLI, I.; DE LUCREZIA, D. Selection dynamic of *Escherichia coli* host in M13 combinatorial peptide phage display libraries. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 75, n. 4, 2011.

ZANIN, F. H.; COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; SILVA COSTA, M. M.; REZENDE, S. A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. ZANIN, F. H.; COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; COSTA, M. M. S.; REZENDE, S. A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P., Evaluation of immuneresponses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes and Infection*, v. 9, p. 1070-1077, 2007.

ZHANG, J. L.; GUO, J. J.; ZHANG, Z. Y.; JING, Y. X.; ZHANG, L.; GUO, R.; YAN, P.; CHENG, N. L.; NIU, B.; XIE, J. Screening and evaluation of human single-chain fragment variable antibody against hepatitis B virus surface antigen. *Hepatobiliary Pancreatic Diseases International*, v. 5, n. 2, p. 237-41, 2006.

ANEXOS