

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA

PEPTÍDEOS SOLÚVEIS DE LEISHMANIA SPP. CONJUGADOS EM
NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS COMO ALTERNATIVA PARA
ENSAIOS DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA

CURITIBA

2022

MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA

PEPTÍDEOS SOLÚVEIS DE LEISHMANIA SPP. CONJUGADOS EM
NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS COMO ALTERNATIVA PARA
ENSAIOS DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Ricardo Andrez Machado de Ávila

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Oliveira, Maria Eduarda de

Peptídeos solúveis de Leishmania spp. conjugados em nanopartículas superparamagnéticas com alternativa para ensaios de imunoabsorção enzimática / Maria Eduarda de Oliveira. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia..

Orientador: Prof °. Drº. Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Leishmaniose. 2. Ensaio de imunoabsorção enzimática. 3. Diagnóstico. 4. Nanopartículas de magnetita. 5. Peptídeos. I. Machado-de-Ávila, Ricardo Andrez. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA** intitulada: **Peptídeos solúveis de *Leishmania spp.* conjugados em nanopartículas superparamagnéticas como alternativa para ensaios de imunoadsorção enzimática**, sob orientação do Prof. Dr. RICARDO ANDREZ MACHADO DE AVILA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

19/12/2022 20:47:47.0

RICARDO ANDREZ MACHADO DE AVILA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

19/12/2022 16:18:29.0

JULIANA FERREIRA DE MOURA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

20/12/2022 13:39:50.0

EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1695 - E-mail: posmpp@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 243031

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e leia o código 243031

Dedico esse trabalho à minha mãe, que acreditou no meu sucesso antes mesmo de eu ter conquistado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar, iluminar e me dar sabedoria para concluir mais um propósito que Ele colocou na minha vida e por me amparar em meio as tribulações.

Agradeço minha família, pai, mãe e irmãos por serem meu suporte diário a quem serei eternamente grata por tudo que representam na minha vida. Obrigada pelos incentivos, por acreditarem em mim e estarem todos os dias do meu lado.

Sou grata ao meu namorado, João Victor, que me acompanhou em mais uma conquista, estando presente durante toda minha trajetória acreditando no meu potencial, ouvindo minhas queixas e que nunca deixou de estar ao meu lado. Essa conquista é nossa!

Agradeço imensamente também as minhas amigas e pessoas que conheci durante esse período dentro do laboratório e que levarei para a vida. Gratidão especialmente a Ellen e a Mari, por terem estado do meu lado durante esses dois anos, me incentivando, ajudando e compartilhando momentos e conversas que guardarei para sempre em meu coração.

Agradecimento especial também ao meu orientador Ricardo, por ter acreditado em mim, por ter me inserido de volta no meio científico e me dado a oportunidade de crescer dentro do seu grupo. Obrigada por todas as conversas, puxões de orelha, ensinamentos e paciência. Eterna gratidão e admiração por você!

Obrigada a todos os meus colegas do grupo Biotech e Laboratório de Fisiopatologia Experimental por esses dois anos de parceria e apoio. Eternamente grata pela ajuda de cada um!

Não posso deixar de agradecer também ao Prof. Marcel, que marcou minha trajetória na Pós-graduação com seus conselhos e conversas. E a todos os professores e colegas que conheci durante meu mestrado, mesmo a distância, muito obrigada!

Enfim, obrigada a todos que participaram de alguma forma dessa conquista.

“E a paz de Deus, que excede todo o entendimento, guardará os vossos corações e os vossos pensamentos em Cristo Jesus.” Filipenses 4:7

RESUMO

As leishmanioses são um espectro de doenças, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que se apresentam nas formas de Leishmaniose Tegumentar cutânea, muco cutânea ou disseminada; e Leishmaniose Visceral dependendo da espécie do parasito. Em diversos países do mundo, incluindo o Brasil, é um problema de saúde pública. Assim é importante o controle epidemiológico da doença e a necessidade de um diagnóstico eficaz como medidas profiláticas. No entanto, os diagnósticos existentes apresentam deficiências, principalmente no que se diz respeito a reatividade cruzada com proteínas de outros parasitas. Para aprimorar o sorodiagnóstico, as nanopartículas magnéticas têm sido aplicadas no diagnóstico imunológico principalmente devido às suas propriedades de se desprender rapidamente de um campo magnético externo, o que reduz o tempo de diagnóstico. A funcionalização desses nanomateriais também permite o isolamento específico de analitos alvo, melhorando a sensibilidade e a eficiência de imunoenaios, como o ensaio ELISA. O presente estudo teve como objetivo conjugar um peptídeo antigênico de *Leishmania* spp. preditos a partir de ferramentas de bioinformática em nanopartículas superparamagnéticas (NPSPMs) funcionalizadas com poli(etilenoglicol) (PEG) sintetizadas pelo método de coprecipitação como alternativa para melhorar o sorodiagnóstico de leishmaniose. Por meio de ferramentas de bioinformática, foi selecionada uma das 17 proteínas hipotéticas de *L. infantum*: LiHyT (XP_001465138.1). Essa proteína demonstrou ser conservada entre as principais espécies de *Leishmania* e pouco conservada em outras espécies de *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Mycobacterium*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* e *Toxoplasma*. A partir desta proteína, foram preditos dois epítomos de células B através do programa ABCPred. Em seguida, o epítomo de célula B que apresentou boa solubilidade em água e continha pelo menos um aminoácido cisteína em sua sequência foi selecionado e nomeado de pept1. Este antígeno peptídico foi então associado as NPSPMs/PEG através do ancoramento pela cisteína e avaliado sua capacidade de diagnóstico em um imunoensaio enzimático otimizado. Os resultados apresentaram acurácia diagnóstica de LTH de 0,8398 com sensibilidade de 75% (95 IC% 50,50 - 89,82) e especificidade de 87,50% (95 IC% 71,93 - 95,03) e acurácia de LVH de 0,9258 com sensibilidade de 87,50% (95 IC% 63,98 - 97,78) e especificidade 87,50% (95 IC% 71,93 - 95,03). Os resultados obtidos podem levar ao uso do antígeno proposto para fins comerciais e levar a novos métodos de nanodiagnóstico nos locais de atendimento.

Palavras-chave: Leishmaniose; Diagnóstico; ELISA nanomagnético; Nanopartículas Superparamagnéticas; Peptídeos.

ABSTRACT

Leishmaniases are a spectrum of diseases, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which are presented in the forms of Cutaneous Tegumentary Leishmaniasis, mucocutaneous or disseminated Leishmaniasis; and Visceral Leishmaniasis depending on the parasite species. In several countries around the world, including Brazil, it is a public health problem. Thus, the epidemiological control of the disease is important and the need for an effective diagnosis as prophylactic measures. However, existing diagnostics have shortcomings, especially with regard to cross-reactivity with proteins from other parasites. To improve serodiagnosis, magnetic nanoparticles have been applied in immunological diagnosis mainly due to their properties of quickly detaching themselves from an external magnetic field, which reduces diagnostic time. The functionalization of these nanomaterials also allows the specific isolation of target analytes, improving the sensitivity and efficiency of immunoassays, such as the ELISA assay. The present study aimed to conjugate an antigenic peptide from *Leishmania spp.* predicted from bioinformatics tools in superparamagnetic nanoparticles (SPMSPs) functionalized with poly(ethylene glycol) (PEG) synthesized by the coprecipitation method as an alternative to improve the serodiagnosis of leishmaniasis. Using bioinformatics tools, one of the 17 hypothetical *L. infantum* proteins was selected: LiHyT (XP_001465138.1). This protein proved to be conserved among the main species of *Leishmania* and poorly conserved in other species of *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Mycobacterium*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* and *Toxoplasma*. From this protein, two B-cell epitopes were predicted using the ABCPred program. Then, the B cell epitope that showed good solubility in water and contained at least one cysteine amino acid in its sequence was selected and named pept1. This peptide antigen was then associated with SPMNPs/PEG through cysteine anchorage and evaluated for its diagnostic capacity in an optimized enzyme immunoassay. The results showed an TL diagnostic accuracy of 0.8398 with a sensitivity of 75% (95 CI% 50.50 - 89.82) and specificity of 87.50% (95 CI% 71.93 - 95.03) and accuracy of VL of 0.9258 with sensitivity of 87.50% (95 CI% 63.98 - 97.78) and specificity 87.50% (95 CI% 71.93 - 95.03). The results obtained may lead to the use of the proposed antigen for commercial purposes and lead to new nanodiagnostic methods at the point of care.

Keywords: Leishmaniasis; Diagnosis; Nanomagnetic ELISA; Superparamagnetic Nanoparticles; Peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida biológico da <i>Leishmania spp.</i>	20
Figura 2 - Vetor e formas evolutivas do gênero <i>Leishmania spp.</i>	21
Figura 3 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Humana.	23
Figura 4 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral.....	24
Figura 5 - Alinhamento e predição dos epítomos de células B da proteína LiHyT.	36
Figura 6 - Imagens TEM	37
Figura 7 - Análise FTIR	39
Figura 8 - Determinação das curvas ROC.....	40
Figura 9 - Reatividade sorológica utilizando peptídeo sintético associado a nanopartículas superparamagnéticas como antígeno para o sorodiagnóstico de LT e LV	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - A sequência peptídica de acordo com a posição do aminoácido da proteína LiHyT	36
Tabela 2 - Raio hidrodinâmico (RH), índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta (mV).....	37
Tabela 3 - Parâmetros da análise ROC do ELISA baseado em peptídeo nanomagnético para detecção específica de IgG usando pept1-NPSPMs como antígeno para sorodiagnóstico de LTH e LVH.	40

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Aa – Aminoácido

ABCpred – Predição de epítipo de célula B baseado em Rede Neural Artificial

ABS – Absorbância

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AUC – Acurácia (área sob a curva ROC)

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search*

BLAST-p – do inglês *Protein Basic Local Alignment Search*

BSA - Albumina de soro bovino

Cis – Cisteína

Cis-NPSPMs - Nanopartículas superparamagnéticas e cisteína

Cm - centímetro

COVID-19 – do inglês *Corona Virus Disease 2019*

Cut-off – Ponto de corte

DAT – Teste de aglutinação direta

DCM – Diclorometano

DIC - N,N-diisopropilcarbodiimida

DLS – Dispersão dinâmica de luz

Dm – Diâmetro médio

DMF – Dimetilformamida

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

DP – Desvio padrão

ELISA – Ensaio imunoabsorbância enzimática

Es – Especificidade

FMOC - 9-fluorenil metoxycarbonil

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

GenBank - Banco de dados de nucleotídeos público

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humano

H₂O - Hidróxido de hidrogênio (água)

IC – Intervalo de confiança

IEDB – do inglês *Immune Epitope Database and Analyses Resource*

ISTs – Infecções Sexualmente Transmissíveis

KBr – Brometo de potássio

k-DNA – DNA do cinetoplasto

LC – Leishmaniose cutânea

LMC – Leishmaniose mucosa ou muco-cutânea

LT – Leishmaniose tegumentar

LTH – Leishmaniose tegumentar humana

LV – Leishmaniose visceral

LVH – Leishmaniose visceral humana

LV/HIV – Leishmaniose visceral associada ao Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humano

MET – Metanol

NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*

Nm - nanômetros

NPMs – Nanopartículas magnéticas

NPSPMs – Nanopartículas superparamagnéticas

PEG-NPSPMs - Nanopartículas superparamagnéticas conjugadas com polietilenoglicol

Pept1-NPSPMs/PEG - Nanopartículas superparamagnéticas conjugadas com polietilenoglicol associadas ao peptídeo 1

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDI – Índice de polidispersidade

PBS – Solução salina fosfato

PBS-T – Solução salina fosfato *Tween*

PEG - Polietilenoglicol

Pept1 – Peptídeo 1

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

ROC – do inglês *Receiver Operating Characteristic*

Se – Sensibilidade

OPD – Dicloridrato de o-fenilenodiamina

Oxima – etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) acetato

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão

TES – Trietilsilano

TFA – Ácido trifluoracético

WHO – do inglês *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 VISÃO GERAL DA LEISHMANIOSE	19
2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE	22
2.3 DIAGNÓSTICO ATUAL DAS LEISHMANIOSES.....	24
2.4 BIOINFORMÁTICA E SUAS APLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO	26
2.5 NANOTECNOLOGIA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE TESTE SORODIAGNÓSTICO	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 MATERIAIS	29
3.2 AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS	29
3.3 SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS	30
3.4 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS ESPECÍFICOS DE CÉLULAS B.....	31
3.5 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS	31
3.6 SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS (NPSPMS) COM POLIETILENOGLICOL	32
3.7 CONJUGAÇÃO PEPTÍDEO- NPSPMS.....	33
3.8 CARACTERIZAÇÃO DE NPSPMS	33
3.9 ELISA NANOMAGNÉTICO	34
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	35
4.1 SELEÇÃO DE ANTÍGENO	35
4.2 FUNCIONALIZAÇÃO DE CISTEÍNA EM NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO.....	36
4.3 ESTUDO DE ACURÁCIA PARA AVALIAÇÃO DE UM ANTÍGENO PARA NANO SORODIAGNÓSTICO DE LT, LV E LV/HIV	39

4.4 SORODIAGNÓSTICO ELISA BASEADO EM PEPTÍDEOS USANDO NANOMATERIAIS	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias, consideradas negligenciadas, causadas por mais de 20 espécies de parasitos protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidas aos hospedeiros vertebrados pela picada da fêmea infectada da subfamília Phlebotominae. No momento do repasto sanguíneo formas promastigotas metacíclicas são inoculadas e a infecção é causada por parasitas protozoários da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania* (BEKHIT et al., 2018).

A manifestação clínica das leishmanioses se apresenta sob as formas: leishmaniose tegumentar (LT), que abrange as formas cutânea (LC) ou mucosa (LM) da doença e leishmaniose visceral (LV). No Brasil, a LT pode ser causada pelas espécies de *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*, enquanto a LV é causada pela espécie *L. infantum*. Dentre as formas da doença, a LV é considerada a mais grave devido à sua alta letalidade, alcançando 95% dos casos quando aguda e não tratada (ARENAS et al., 2017).

O método de diagnóstico da leishmaniose mais amplamente utilizado atualmente, considerado padrão-ouro, é o exame parasitológico que através da microscopia consiste na busca por formas amastigotas em amostras de aspirados do baço, medula óssea e linfonodos. Outras técnicas também podem ser utilizadas como a detecção de kDNA de *Leishmania* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), além de testes imunológicos como a imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), teste de aglutinação direta (DAT) e testes imunocromatográficos. Entretanto, os testes apresentam dificuldade na aplicabilidade, a coleta de amostras é considerada invasiva e há variações quanto a sua sensibilidade e/ou especificidade (ELMAHALLAWY et al., 2014; GOTO; LINDOSO, 2014; MONTALVO et al., 2012). Neste sentido é prioritário o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis, precisos, inovadores e mais rápidos para este tipo de doença.

O ELISA é uma das técnicas mais utilizadas para diagnosticar diferentes tipos de doenças infecciosas, como doenças parasitárias, infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) ou doenças virais como COVID-19, gripes, hepatites (SOLER et al., 2020). O sorodiagnóstico é uma boa alternativa de método diagnóstico pouco invasivo de coleta de amostras, pois a concepção da tecnologia envolve abordagem de avaliação imunológica por meio de amostras de soro ou sangue. No entanto, os

atuais sorodiagnósticos de LT e LV apresentam problemas relacionados principalmente à sua sensibilidade e especificidade variáveis, decorrentes de baixos níveis de anticorpos anti-Leishmania ou reatividade cruzada com outras doenças endêmicas, como doença de Chagas, malária e tuberculose (LAGE et al. 2016). Outro problema dos testes de sorodiagnóstico amplamente utilizados para LT e LV diz respeito à sensibilidade (Se) e especificidade (Es) variáveis em pacientes coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), uma vez que a coinfeção pelo HIV é comum nos mesmos países onde ambas as doenças são endêmicas (RIBEIRO et al., 2018).

A fim de melhorar o sorodiagnóstico, a nanotecnologia tem apresentado uma série de soluções para a área biomédica e tem atraído a atenção de diversas áreas de pesquisa e tem sido aplicada para fornecer melhorias nos ensaios diagnósticos, aumentando a sensibilidade, amplificando os sinais nas reações enzimáticas, e o nanosorodiagnóstico é mais custo-efetivo e acessível em tempo, melhorando o desempenho da técnica de imunodiagnóstico (ARCA-LAFUENTE et al., 2020; KHODADADI et al., 2021; ORTEGA; PÉREZ-RODRÍGUEZ; REGUERA, 2017; ZHANG et al., 2019). As nanopartículas têm sido usadas devido às suas propriedades, advindas de efeitos de tamanho e forma, e suas propriedades magnéticas e eletrônicas são eficientes devido aos fenômenos de superfície reduzidos que possibilitam sua fácil funcionalização com proteínas e peptídeos, possibilitando uma estratégia eficaz no campo do diagnóstico (OH et al., 2018). Essa associação pode melhorar a sensibilidade, amplificar os sinais nas reações enzimáticas e o nanosorodiagnóstico possui um maior custo-benefício (HA et al., 2018).

Nesse cenário, como novas alternativas focadas na busca em solucionar os problemas relacionados à baixa sensibilidade e/ou especificidade dos testes diagnósticos, a identificação de novos antígenos torna-se uma prioridade, visando desenvolver novos testes de detecção de leishmaniose, através de análises de bioinformática e tecnologia de peptídeos para melhorar o diagnóstico imunológico e associação de sucesso com a nanotecnologia, para validação de uma plataforma ELISA baseada em peptídeos nanomagnéticos usando peptídeos como antígeno da leishmaniose.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar uma metodologia de ensaios magnéticos de imunoadsorção enzimática a partir de um peptídeo antigênico de *Leishmania spp.* conjugado em nanopartículas superparamagnéticas funcionalizadas com poli(etilenoglicol) como alternativa para o sorodiagnóstico de leishmaniose.

1.1.2 Objetivos específicos

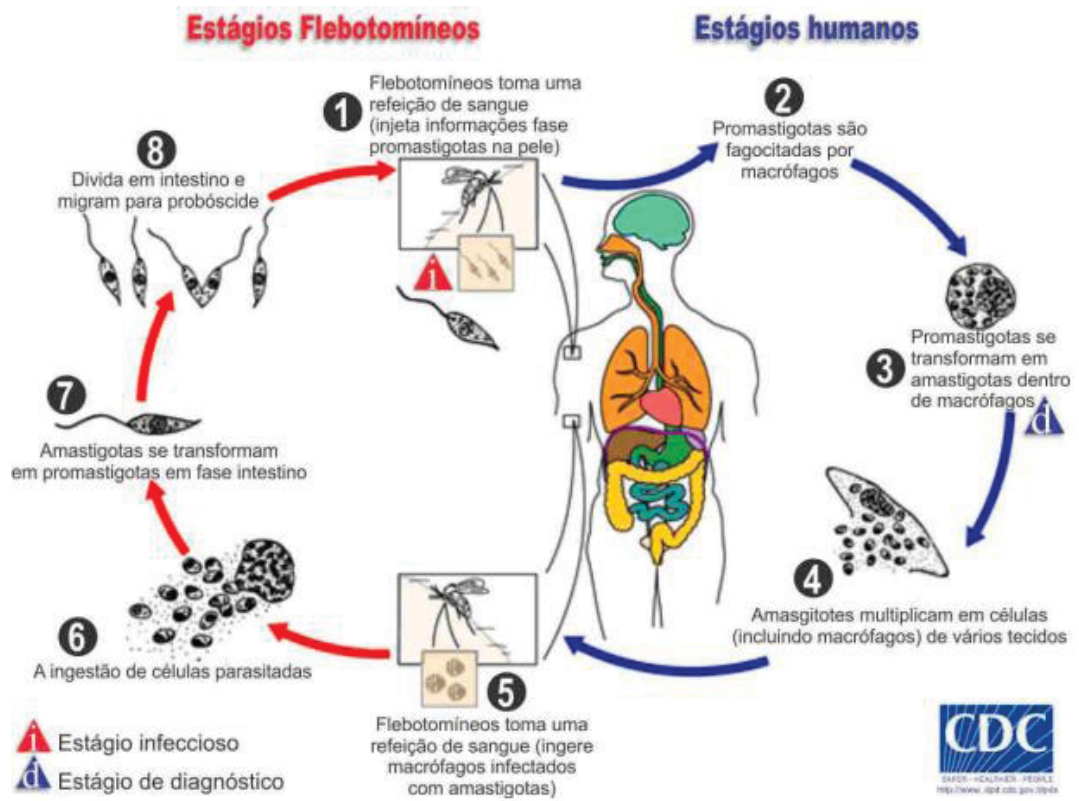
- Selecionar proteínas de *L. infantum* através da comparação de similaridade da estrutura primária com espécies de *Leishmania* e dos gêneros *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Mycobacterium*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* e *Toxoplasma*;
- Predizer epítomos específicos para células B humanas da proteína selecionada por meio dos programas de bioinformática ABCpred e IEDB;
- Escolher o epítomo que apresente maior solubilidade em água e possua o aminoácido cisteína na sua estrutura;
- Sintetizar o epítomo predito específico de linfócitos B humanos, através da síntese química de peptídeos.
- Sintetizar e funcionalizar com poli(etilenoglicol) nanopartículas superparamagnéticas pelo método de coprecipitação;
- Conjugar o peptídeo escolhido em nanopartículas superparamagnéticas/poli(etilenoglicol) por ancoramento à cisteínas;
- Caracterizar as nanopartículas com propriedades magnéticas;
- Testar por ELISA nanomagnético o potencial diagnóstico do antígeno produzido frente amostras de soros de indivíduos não-infectados residentes em áreas endêmicas e não endêmica da doença, bem como pacientes com LTH, LVH, LV/HIV, Doença de Chagas e hanseníase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VISÃO GERAL DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias consideradas negligenciadas e são provocadas por meio de protozoários, sendo transmitida entre os hospedeiros mamíferos através de vetores flebotomíneos, popularmente conhecido como mosquito-palha. No Novo Mundo, o vetor pertence ao gênero *Lutzomyia*, enquanto no Velho Mundo, ao gênero *Phlebotomus*. A doença foi historicamente limitada às regiões tropicais e subtropicais, manifestando-se também para outras regiões não endêmicas, devido ao aumento da migração de pessoas não imunizadas para áreas endêmicas, e porque o vetor (mosquito) pode transmitir a doença entre mamíferos, por exemplo de cães para os humanos (DESJEUX, 2004) e com isso o padrão de propagação da doença mudou ao longo do tempo (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Como observado na Figura 1, os parasitas de *Leishmania* são organismos dimórficos, ou seja, com duas formas morfológicas nos seus estágios de vida. Um estágio de desenvolvimento extracelular no inseto flebótomo fêmea e, um estágio de desenvolvimento em mamíferos, de caráter intracelular (ARENAS et al., 2017). Os insetos transmissores dos parasitos são fêmeas hematófagas de diversas espécies conhecidas genericamente como flebotomíneos, da Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, subgêneros Nyssomyia e Psychodopygus pertencentes a várias espécies e diferentes gêneros (*Psychodopygus*, *Lutzomyia*), dependendo da localização geográfica. Nas Américas, existem aproximadamente 30 espécies de *Lutzomyia* com comprovada capacidade de transmitir *Leishmania spp.* (COELHO et al., 2012; SRIVIDYA et al., 2012).

Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania spp.*

FONTE: Adaptado de *Laboratory Identification of Parasites* (2022).

A Figura 2 demonstra as fases de vida da *Leishmania spp.* sendo que nos flebotomíneos (Figura 2A), o desenvolvimento do parasita ocorre no canal alimentar com a formação de uma forma móvel, flagelada e alongada denominada "promastigota" (Figura 2B). O promastigota amadurece no intestino médio do inseto e origina uma forma promastigota metacíclica infecciosa. A inoculação no hospedeiro mamífero ocorre quando os flebotomos se alimentam de sangue, o que é um requisito para a oviposição (BACELLAR, 2005). Em cada inoculação cerca de 100 a 1.000 formas promastigotas metacíclicas são transmitidas. Estas formas, rapidamente são fagocitadas por leucócitos, particularmente macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Já nas células do hospedeiro, os parasitas passam por uma nova transformação para originarem a forma amastigota (Figura 2C). (PINHEIRO, 2004).

Figura 2 - Vetor e formas evolutivas do gênero *Leishmania* spp.



A - Vetor flebotomíneo popularmente conhecido como mosquito-palha, vetor da leishmaniose.
 B - Forma promastigota, flagelada e móvel. C - Forma amastigota, aflagelada e imóvel da leishmaniose.

FONTE: Ministério da Saúde (2022).

Após a infecção, surgem as manifestações clínicas da doença, que estão em sua maioria associadas ao estado imunológico do hospedeiro e à espécie infectante do parasita, sendo que a infecção em mamíferos pode ser causada por mais de 20 espécies diferentes do protozoário. A manifestação clínica das leishmanioses se apresenta sob as formas: leishmaniose tegumentar (LT), que abrange as formas cutânea (LC) ou mucosa (LM) da doença e leishmaniose visceral (LV). No Brasil, a LT pode ser causada pelas espécies de *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*, enquanto a LV é causada pela espécie *L. infantum*. Dentre as formas da doença, a LV é considerada a mais grave devido à sua alta letalidade, alcançando 95% dos casos quando aguda e não tratada (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Em relação às espécies de *Leishmania*, atualmente existem 30 espécies conhecidas das quais 21 são causadoras de doenças que podem infectar mamíferos. Isso inclui o complexo *Leishmania donovani* com duas espécies: *L. donovani* e *L. infantum*; e o complexo *Leishmania mexicana*, que abrange quatro espécies: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* e *L. tropica*. Estes parasitas são morfologicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciados por análise isoenzimática e análise de sequências de DNA (MCCONVILLE; NADERER, 2011).

As leishmanioses são doenças proeminentes e de grande preocupação de saúde pública em quase 100 países no mundo e é encontrada em quase todos os continentes, com exceção da Austrália e na Antártica. Atualmente, é responsável por cerca de 12 milhões de casos ao ano (GOYAL; KESHAV; KAUR, 2021). Dentre os

países com maior número de casos, encontra-se o Brasil com mais de 16 mil registros no ano de 2021 (OPAS, 2021). Globalmente, estima-se que ocorram cerca de 600 mil a 1 milhão de novos casos de LT e de 50 mil a 90 mil casos de LV por ano sendo que, destes, apenas 25 a 45% são relatados à Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2021).

A pandemia do COVID-19 afetou diretamente as ações de vigilância e controle das doenças. No caso das leishmanioses, deve-se destacar o impacto da pandemia nas ações de busca ativa, detecção precoce e tratamento de casos, bem como em outras atividades de campo. Entre os desafios, destaca-se a necessidade de os países retomarem as ações e avançarem com o diagnóstico e tratamento (DE SOUZA et al., 2020).

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE

As formas clínicas de manifestação da leishmaniose podem variar entre os hospedeiros desde lesões cutâneas simples de cura espontânea a um comprometimento visceral que pode ser fatal quando não tratado. Tais manifestações podem ser divididas em dois grandes grupos: Leishmaniose Tegumentar (LT) que se subdivide em Leishmaniose Tegumentar Americana, no Novo Mundo e Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo; e a Leishmaniose Visceral (LV) que se apresenta como a forma mais grave da doença (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). O resultado da infecção parasitária varia de uma doença assintomática e/ou subclínica até a doença sintomática aguda.

As manifestações clínicas da LT podem variar desde infecções assintomáticas, apresentação de lesões cutâneas simples (Figura 3A), úlceras mucocutâneas (Figura 3C) até a forma difusa (Figura 3B), considerada a apresentação mais forte da doença e de difícil tratamento. Normalmente, a maioria dos infectados apresentam lesões em partes visíveis na cabeça, mãos e braços (FABER et al., 2012). Essas lesões dão origem às úlceras que contêm bordas elevadas e mais rígidas com erosão central que podem ser cobertas com uma crosta. A forma cutânea disseminada da LT é caracterizada por lesões acneiformes que podem se ulcerar e, histopatologicamente, há infiltrado eosinófilo ou linfoplasmocitário, com os parasitas podendo ou não ser detectados na lesão (PINHEIRO, 2004). A resposta imune é variável, enquanto na cutânea difusa o comprometimento da mucosa nasal não é

observado, na forma disseminada esse envolvimento é muito frequente (ALMEIDA; SANTOS, 2011). Acredita-se que a ocorrência de leishmaniose clinicamente manifestada esteja na dependência de fatores inerentes ao parasita e da resposta imunológica do indivíduo infectado.

Figura 3 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Humana.



A- Forma cutânea simples da Leishmaniose Tegumentar; B- Forma difusa da Leishmaniose Tegumentar; C - Forma Mucosa da Leishmaniose Tegumentar.

Fonte: Ministério da Saúde (2017).

Outro tipo de manifestação clínica da doença, é a forma visceral da leishmaniose sendo a mais grave e que pode ser fatal, compreendendo uma ampla gama de manifestações clínicas e sintomatologia. A LV é letal se não tratada e é listada pela OMS como uma das principais doenças infecciosas mais importantes com alta capacidade de causar epidemias em larga escala (DESJEUX, 2001). O parasito invade e multiplica-se nos órgãos do sistema fagocitário mononuclear como o baço, fígado e nódulos linfáticos, originando sintomas como febre prolongada e irregular, esplenomegalia, linfadenopatia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progressiva, perda de peso e hipergamaglobulinemia com hipoalbuminemia (ROOSEVELT et al., 2007). Em muitos casos, pode acontecer da infecção não ter um curso agudo ou crônico, permanecendo assintomática ou subclínica e, em certos casos, pode ocorrer um desenvolvimento de autocura. As espécies responsáveis por esta forma de leishmaniose são *L. donovani* e *L. infantum* (ZUCCA; SAVOIA, 2011).

Além da alta incidência e mortalidade provocada pela LV, a doença também é considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BRASIL, 2015). O HIV pode modificar a progressão das leishmanioses devido a imunodepressão causada por este. A incidência das duas doenças tem resultado em um drástico aumento nos casos registrados de coinfeção

LV/HIV no Brasil, chegando a 11,1% do total de casos confirmados em 2019 (SAÚDE, 2021).

Pacientes coinfetados com LV/HIV apresentam maior letalidade pela imunossupressão desenvolvida, podendo influenciar diretamente em complicações clínicas, dificuldade no tratamento e ineficiência do diagnóstico. Sua progressão caminha de acordo com a resposta imunológica do indivíduo, podendo ocorrer de forma acelerada devido a imunossupressão induzida pela coinfeção levando a uma maior replicação viral, evoluindo para a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LINDOSO et al., 2018). O diagnóstico da coinfeção LV/HIV pode ter implicações na abordagem da leishmaniose quanto à indicação terapêutica, ao monitoramento de efeitos adversos, à resposta terapêutica e à ocorrência de recidivas.

Figura 4 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral.



A-Manifestações clínicas na fase inicial da Leishmaniose Visceral Humana (LV); B- Manifestações clínicas na fase avançada Leishmaniose Visceral Humana (LV).

Fonte: Ministério da Saúde (2014)

2.3 DIAGNÓSTICO ATUAL DAS LEISHMANIOSES

O diagnóstico atual da Leishmaniose é realizado por meio de exames clínicos e epidemiológicos, que devem ser associados a testes laboratoriais que podem ser parasitológicos (diagnóstico de certeza) ou sorológicos (UTZINGER et al., 2012). Os aspectos clínicos muitas vezes não são suficientes por apresentarem sintomatologias variadas de acordo com a espécie do parasito e a resposta imune do hospedeiro. Os

exames parasitológicos consistem na busca, por meio de microscopia óptica, por formas amastigotas em amostras de aspirados, como do baço, medula óssea e linfonodos e de raspados de lesões cutâneas ou muco cutâneas e ainda contemplam o padrão-ouro para o diagnóstico da leishmaniose (LAMMIE et al., 2011).

Para diagnóstico da LT os métodos parasitológicos são considerados como padrão de referência devido à sua alta especificidade. Para realização do método parasitológico é necessária a coleta do material que pode ser obtido por raspagem, punção aspirativa ou biópsia de lesões. No entanto sua sensibilidade varia dependendo da localização geográfica, espécie do parasito e estágio da lesão. Para melhorar sua sensibilidade normalmente são associados múltiplos testes diagnósticos parasitológicos ou diagnósticos imunológicos. Pode atingir 100% de especificidade, entretanto, sua sensibilidade é reduzida, pois parasitas podem ou não estarem presentes nas amostras coletadas (ELMAHALLAWY et al., 2014; MONTALVO et al., 2012). Para realização do método parasitológico no diagnóstico da LV é necessária a coleta das células teciduais, e a sua sensibilidade depende do tecido em que se realiza a coleta devido à distribuição do parasito não ser homogênea nos tecidos (THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020).

Outras técnicas são também aplicadas, como a detecção de kDNA de *Leishmania* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), além de testes imunológicos como a imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), teste de aglutinação direta (DAT) e testes imunocromatográficos (OLIVEIRA-DA-SILVA et al., 2020). Entretanto, os testes apresentam dificuldade na aplicabilidade, a coleta de amostras é considerada invasiva e há variações quanto a sua sensibilidade e/ou especificidade (LAGE et al., 2016).

Os autores destacam que técnicas sorológicas possuem limitações de uso, uma vez que os anticorpos podem permanecer presentes após o tratamento (cicatriz sorológica), limitando a avaliação da resposta terapêutica. Outro aspecto a ser observado é a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outras doenças, como tripanossomíase, hanseníase, malária, esquistossomose, tuberculose e outras leishmanioses provocando a obtenção de resultados falsos-positivos nos testes sorológicos (OSWALDO CRUZ et al., 2021). Tal fato torna as medidas de diagnóstico limitadas e pouco eficientes, muitas vezes não sendo realizados de forma correta. Por outro lado, abordagens sorológicas para detectar anticorpos específicos contra um agente infeccioso constituem uma alternativa valiosa para testes diagnósticos

precoces, rápidos e fáceis de usar para infecções humanas e veterinárias, apesar de que nos casos de leishmaniose de pacientes assintomáticos, a detecção torna-se também dificultada devido aos baixos índices de sorologia antileishmanial (RIBEIRO et al., 2018).

A falta de testes rápidos, precisos, de fácil manuseio e no local de atendimento para muitas das doenças tropicais negligenciadas é uma característica importante para a negligência geral e a subvalorização da carga de doenças. Testes diagnósticos eficientes, capazes de fornecer diagnóstico precoce e preciso, são essenciais na determinação da escolha do tratamento e na vigilância epidemiológica de doenças infecciosas (SCHWARZ et al., 2017). As leishmanioses, em sua maioria, permanecem com uma falha de diagnóstico, já que requerem de treinamento aprofundado para a identificação confiável do parasito, preparação e coleta correta de amostras e a falta de maquinário adequado em laboratório e clínicas o que dificulta o diagnóstico em áreas rurais e remotas (UTZINGER et al., 2012).

2.4 BIOINFORMÁTICA E SUAS APLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO

A bioinformática vem crescendo em novas estratégias de diagnóstico. A bioinformática é uma área multidisciplinar que por meio de programas computacionais é possível visualizar, analisar e armazenar informações de moléculas biológicas (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

Um dos grandes focos do estudo da bioinformática é a identificação de epítomos, a qual tem se mostrado uma ferramenta útil para o desenvolvimento de antígenos para detecção de anticorpos específicos contra diversas doenças (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000). A bioinformática permite o modelamento de regiões específicas presentes em proteínas chaves da estrutura de diversos microorganismos a fim de melhorar o diagnóstico, aumentando a especificidade e evitando reações cruzadas devido ao alto grau de similaridade entre as sequências, além de possibilitar a predição destas regiões de forma a desenhar peptídeos que mimetizam regiões epitópicas conformacionais, visto que estes são mais comuns na interação antígeno-anticorpo (SUN et al., 2013, 2016; YANG; YU, 2009).

As células B secretam anticorpos, que se ligam a antígenos. A parte específica dos antígenos que são reconhecidos pelos anticorpos são chamados de epítomos de células B. Esses epítomos podem ser peptídeos lineares curtos (contínuos), correspondendo a resíduos de aminoácidos contidos na superfície de um

antígeno, ou conformacionais (descontínuos), caso em que os resíduos não são sequenciais na estrutura primária, mas estão em estreita proximidade dentro da estrutura 3D da proteína dobrada (POTOCNAKOVA; Bhide; PULZOVA, 2016; ZHOU et al., 2022).

Compreendendo a abordagem computacional da bioinformática e a ampla gama de aplicações em que ela pode ser inserida, estudos estão sendo aplicados para rastrear alvos biológicos no tratamento da leishmaniose, como para identificar marcadores antigênicos importantes no desenvolvimento de vacinas e de kits diagnósticos (DUARTE et al., 2017). Atualmente a proteína recombinante K39 (rK39) é utilizada no diagnóstico da leishmaniose, mas existe uma grande problemática quanto a sua especificidade, pois não pode ser usada para diferenciar indivíduos infectados de indivíduos infectados assintomáticos. A proteína recombinante não extingue a possibilidade de reações cruzadas, visto que mantém conservadas regiões de alta similaridade com outras proteínas de outros microorganismos (MACHADO et al., 2020).

Muitos esforços têm sido investidos na atualização da ação diagnóstica dos epítomos para o diagnóstico da leishmaniose. A direção principal é que um grande número de epítomos localizados em proteínas antigênicas fortes foi previsto, com a esperança de melhorar a especificidade do sorodiagnóstico (GALVANI et al., 2022; LAGE et al., 2016; ZHOU et al., 2022). Como a maioria dos determinantes antigênicos reconhecidos por células B e anticorpos são conformacionais, são alvos úteis como antígeno de revestimento em ELISA.

Ademais, os peptídeos são vantajosos em relação às proteínas recombinantes como grandes candidatos a antígenos de revestimento, porque são mais estáveis e duradouros, além que as proteínas se degradam mais facilmente quando expostas a grandes variações de temperatura e oscilações de pH, tendo maiores custos e complexidade de produção quando comparadas a peptídeos (FARIA et al., 2015; FELICIANO et al., 2016).

2.5 NANOTECNOLOGIA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE TESTE SORODIAGNÓSTICO

A aplicação de nanomateriais tem apresentado uma série de soluções para a área biomédica e tem atraído a atenção de diversas áreas de pesquisa (MEDEIROS

et al., 2011). O uso de nanopartículas tem gerado um grande interesse devido às suas propriedades físicas e químicas, como a alta proporção entre área e volume de superfície, estabilidade química e facilidade de funcionalização com biomoléculas de interesse (DAHIYA; K MEHTA, 2021).

Atualmente, as nanopartículas estão sendo estudadas para serem aplicadas em imunoenaios, para resolver problemas de sensibilidade e eliminar reações não específicas, evitando diagnósticos com resultados falso-positivos ou negativos (CIAURRIZ et al., 2017; LIANG et al., 2016). Entre esses nanomateriais, as nanopartículas magnéticas (NPMs), obtidas a partir do óxido de ferro, são amplamente utilizadas por apresentarem um perfil biocompatível, alta estabilidade, baixo custo, fácil modificação da superfície e propriedades superparamagnéticas (MBEH et al., 2012; MEDEIROS et al., 2011). As NPMs fornecem uma separação rápida quando expostas a um campo magnético externo, uma característica conveniente para sua aplicação em imunoenaios (SINGH; SAHOO, 2014; URUSOV et al., 2014).

Um estudo de Feuser et al., (2021) demonstrou o uso de nanopartículas magnéticas e poliméricas conjugadas a proteína albumina de soro bovino (BSA) em ensaio ELISA, apresentando um reconhecimento maior de anticorpos no teste nanomagnético quando comparado com o teste ELISA convencional. Com isso a nanotecnologia tem sido aplicada para proporcionar melhorias nos ensaios de diagnóstico para diversas infecções, aumentando a sensibilidade, reduzindo o tempo e o custo de plataformas e melhorando o desempenho da técnica de imunodiagnóstico (GYE; NISHIZAWA, 2020; HA et al., 2018b; HU; SOU; TAKEOKA, 2020; KHODADADI et al., 2021b).

As NPMs também podem ter suas propriedades aprimoradas, funcionalizando sua superfície com várias biomoléculas, polímeros, entre outros (LAURENT et al., 2008; WU; HE; JIANG, 2009). Um exemplo de polímero muito utilizado para funcionalização de nanopartículas é o polietileno glicol (PEG), devido à sua biocompatibilidade e por tornar neutra a superfície de nanomateriais. Além disso é um polímero hidrofílico, altamente solúvel em água, não antigênico e resistente a proteínas (TAI; LAI; ABDUL HAMID, 2016). Outro exemplo de biomolécula que tem característica de funcionalização em nanopartículas magnéticas é a cisteína. A cisteína (cis) é um aminoácido biocompatível com três grupos funcionais: carboxílico (-COOH), amino (-NH₂) e tiol (-SH) que podem se ligar a diferentes moléculas (BAGBI et al., 2017).

Com o avanço da nanotecnologia e os recorrentes estudos para a resolução de grandes problemáticas envolvendo diagnósticos mais eficientes evidencia o potencial promissor desta tecnologia para o desenvolvimento de um sorodiagnóstico eficaz para a leishmaniose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A seringa equipada com um filtro hidrofóbico de polietileno de 3 x 9 (mm) (#20 μ m) foi adquirida da Saint Vallen Biotecnologia Ltda (Porto Alegre, RS, Brasil). A 4-metilpiperidina, DIC (N,N-diisopropilcarbodiimida), Oxima (etil 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato), ácido trifluoroacético (TFA), trietilsilano, 1,2-etanoditiol e 9-fluorenil metoxycarbonil (Fmoc) aminoácidos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil (São Paulo, SP, Brasil). A dimetilformamida (DMF), diclorometano (DCM) e éter etílico foram adquiridos da Neon. Para a síntese das nanopartículas superparamagnéticas foram utilizados os seguintes reagentes: sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de amônio (99%) todos adquiridos da Vetec. Para a funcionalização das NPMs, o polietilenoglicol 400 foi adquirido da Neon. Todos os reagentes foram usados como recebidos e água destilada foi usada em todos os experimentos.

3.2 AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS

As amostras de soros humanos foram cedidas gentilmente pelo grupo do professor Dr. Eduardo Coelho, para a realização dos experimentos e este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque, respeitando os princípios éticos para pesquisa envolvendo seres humanos, e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), com número de protocolo CAAE- 32343114.9.0000.5149.

Os soros foram coletados de LTH (n = 25; incluindo 15 homens e 10 mulheres, com idades variando de 27 a 56 anos), LVH (n = 20, incluindo 10 homens e 10 mulheres, com idades variando de 27 a 64 anos), coinfectados LV/HIV (n = 8, incluindo 4 homens e 4 mulheres, com idade variando de 31 a 55 anos), doença de

Chagas (n = 8, incluindo 4 homens e 4 mulheres, com idade variando de 22 a 50 anos) e Hanseníase (n = 8, incluindo 4 homens e 4 mulheres, com idades variando de 22 a 50 anos) indivíduos não infectados (n = 8, incluindo 4 homens e 4 mulheres, com idades variando de 22 a 50 anos) residentes em área endêmica de leishmaniose (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e indivíduos não infectados (n = 8, sendo 4 homens e 4 mulheres, com idade variando de 22 a 50 anos) residentes em área não endêmica (Criciúma, Santa Catarina, Brasil). Um consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes e voluntários. O diagnóstico de leishmaniose foi confirmado por exames clínicos e exames parasitológicos. A infecção pelo HIV foi baseada na avaliação clínica, contagem de células T CD4 e carga viral nos pacientes. Foram coletadas amostras de soro de pacientes com LTH (n = 6, sendo 4 homens e 2 mulheres, com idades entre 33 e 61 anos) antes e seis meses após o tratamento. Os pacientes foram submetidos ao tratamento com antimoniais pentavalentes (Sb⁺⁵) (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brasil), na dose de 20 mg Sb⁺⁵/kg e durante 30 dias. Nenhum deles sofreu de qualquer outra infecção ou doença pré-existente.

3.3 SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS

Foram analisadas 17 proteínas hipotéticas previamente descritas no estudo imunoproteômico desenvolvido por (COELHO et al., 2012). A partir dessas proteínas, foi selecionada a que apresentava maior similaridade entre espécies distintas de *Leishmania* e menor similaridade com *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Mycobacterium*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* e *Toxoplasma*. Para obter a sequência primária da proteína, realizou-se uma busca utilizando o código da proteína no banco de dados online GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Em seguida, utilizou-se o algoritmo de bioinformática Blast-p (protein-protein BLAST), pertencente ao programa BLAST, para avaliar a similaridade da proteína com as demais proteínas depositadas no banco de dados (ALTSCHUL et al., 1990). Para isso, colocou-se a sequência de aminoácidos da proteína candidata e o parâmetro *non-redundant protein sequences*, obtendo-se então as proteínas com maior similaridade. Após a busca, avaliou-se a similaridade da proteína candidata com as proteínas de *Leishmania* e das espécies de reatividade cruzada descritas acima.

3.4 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS ESPECÍFICOS DE CÉLULAS B

A sequência da proteína selecionada foi submetida ao programa ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), o qual é capaz de prever epítopos lineares de células B baseando-se em padrões de comprimento fixo através de uma rede neural artificial (SAHA; RAGHAVA, 2006). Neste programa, utilizou-se os seguintes parâmetros: *Threshold: 0.85; Window length used for prediction: 14 ou 16; Overlapping filter: ON*. Realizou-se, então, a predição dos possíveis epítopos da proteína selecionada. Ao prever os possíveis epítopos da proteína, as sequências proteicas foram alinhadas através do programa Clustal Ômega, programa que permite realizar o alinhamento de múltiplas sequências. Sendo assim, a proteína candidata foi alinhada com as proteínas obtidas pelo programa BLAST e tiveram os epítopos preditos e identificados na sequência proteica. Assim, foi possível verificar a similaridade dos epítopos preditos com outras proteínas do mesmo gênero e com proteínas dos gêneros responsáveis por reações cruzadas. Desta forma, os epítopos que se mostraram similares às proteínas do gênero de *Leishmania* e não similares aos demais gêneros, foram selecionados.

Para confirmação da predição dos possíveis epítopos, utilizou-se o programa de bioinformática IEDB (www.iedb.org), descrito por Emini et al., (1985). Utilizou-se o algoritmo *Emini Surface Accessibility Prediction*, que permite identificar na sequência da proteína os resíduos de aminoácidos mais acessíveis, sendo estes aminoácidos possivelmente reconhecidos por anticorpos (EMINI et al., 1985). Foi então selecionado dois epítopos da proteína candidata. As sequências de aminoácidos selecionadas foram destacadas na estrutura da proteína, e aquelas consideradas positivas em ambas as análises foram consideradas como bons epítopos e utilizados como peptídeos alvo.

3.5 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

A sequência peptídica escolhida foi sintetizada manualmente por Fmoc Solid phase Peptide Synthesis conforme descrito por Machado-de-Ávila e colaboradores (MACHADO DE AVILA et al., 2011). Nesta técnica, o N-terminal de cada aminoácido é protegido por 9-fluorenil metoxicarbonil (Fmoc). Além disso, existe um grupo de proteção adicional nas cadeias laterais para evitar reações colaterais. A síntese é

realizada em uma seringa de 6 mL com um filtro de polietileno hidrofóbico 3 x 9 (mm) (#20 μm). O resíduo de aminoácido C-terminal é ancorado por meio de seu grupo ácido carboxílico em suporte sólido insolúvel, resina rink. O grupo Fmoc é removido por 4- metilpiperidina 25% em dimetilformamida (DMF) em dois ciclos de desproteção, incubando a solução na seringa por 5 e 15 min. Após são feitas três lavagens com DMF e uma com diclorometano (DCM). O acoplamento do primeiro aminoácido à resina é realizado por ativação do grupo carboxílico com os reagentes de acoplamento, DIC (N, N-diisopropilcarbodiimida) e Oxyma (etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) acetato) por 30 min. Em seguida, são feitas quatro lavagens com metanol intercalado com DMF e uma última lavagem com DCM. Entre todos os ciclos de desproteção e acoplamento, uma etapa de controle colorimétrico de desproteção e acoplamento é realizada usando azul de bromofenol 0,1% em DMF. Quando o terminal N é desprotegido, a cor do peptídeo-resina é azul e, quando protegido, é amarela. Os ciclos de desproteção e acoplamento são realizados até que a cadeia peptídica na resina seja totalmente sintetizada por sucessivas ligações peptídicas que acoplam resíduos de aminoácidos do C-terminal em direção ao N-terminal. Após o último ciclo de desproteção, a etapa de clivagem é realizada para remover os grupos de proteção da cadeia lateral e clivar a cadeia peptídica da resina. A solução de clivagem é composta por ácido trifluoroacético (TFA): H₂O: trietilsilano: 1,2-etanoditiol (92,5: 2,5: 2,5: 2,5, v/v). A clivagem dura em média 3 horas, onde a resina é incubada na solução de clivagem. Após, a solução é filtrada e recolhida em um tubo tipo Falcon. Em seguida, o peptídeo é precipitado em éter etílico gelado (~4°C) e mantido overnight (-20 °C) para ser recuperado por centrifugação. A primeira etapa de centrifugação (10.000 × g, por 10 minutos a 4°C), é realizada após o overnight e posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, o peptídeo é lavado com éter etílico gelado, recentrifugado (10.000 × g, por 10 minutos a 4°C), o sobrenadante descartado mais uma vez e, em seguida, o peptídeo é liofilizado. Os peptídeos sintéticos são então analisados por espectrômetro de massa acoplado a um sistema UPLC e purificados quando necessários.

3.6 SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

SUPERPARAMAGNÉTICAS (NPSPMS) COM POLIETILENOGLICOL

NPSPMs foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, conforme descrito anteriormente por Feuser e colaboradores (FEUSER et al., 2020). A funcionalização foi realizada no momento da síntese, pela adição de polietilenoglicol (3g) à solução de sais de ferro antes da adição da solução de hidróxido de amônio (TAI; LAI; ABDUL HAMID, 2016). Uma hora após o processo de síntese, os PEG-NPSPMs foram separados por aplicação de um campo magnético externo e lavados três vezes com água destilada.

3.7 CONJUGAÇÃO PEPTÍDEO - NPSPMS

O pept1 sintetizado anteriormente foi conjugado com NPSPMs pelo grupo tiol da cisteína presente na sequência do peptídeo. Portanto, NPSPMs foi conjugado com cisteína livre para melhor caracterização da interação entre o grupo cisteína tiol e NPSPMs. Para conjugação, a solução peptídica foi preparada a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e cisteína livre a 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Em seguida, as soluções foram adicionadas individualmente, gota a gota, em um becker contendo NPSPMs revestidas a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e sonicadas por 2 horas em banho ultrassônico. Em seguida, a conjugação pept1-NPSPMs foi submetida a neodímio magnético e lavada com PBS e mantida até novos ensaios. As cisteína-NPSPMs foram expostas a neodímio magnético e lavadas com PBS para remover a cisteína livre para posterior caracterização.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DAS NPSPMS

Os diâmetros médios (D_m) das nanopartículas superparamagnéticas livres, revestidas e funcionalizadas e os índices de polidispersidade (PDI) foram medidos por dispersão dinâmica de luz (DLS) (Nanosizer, Malvern Instruments). A carga superficial das nanopartículas superparamagnéticas livres, revestidas e funcionalizadas foi determinada por medições de potencial zeta (Zetasizer, Malvern Instruments). Para as análises de DLS e potencial zeta, as amostras foram diluídas em água destilada e analisadas em triplicata a 25 °C. A caracterização da morfologia das partículas foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (JEM-1011 TEM 100 kV). As amostras foram diluídas em água destilada até 0,5% de teor de sólidos e, em seguida, colocadas em uma grade de cobre revestida com carbono. A caracterização química foi realizada por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de

Fourier (FTIR) (IRPrestige21, de Shimadzu). As amostras foram secas e adicionadas a pellets de KBr. Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 400 e 4000 cm^{-1} usando uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

3.9 ELISA NANOMAGNÉTICO

Placas convencionais de 96 poços (KASVI) foram sensibilizadas com 100 μL /poço de peptídeos-NPSPMs conjugados, com precipitação magnética por ímã de neodímio (8 x 1,5 mm) aplicados em cada poço por 5 minutos, e foram aplicados em todas as etapas de lavagem. As etapas seguintes foram as descritas por Feuser et al., (2021) com algumas adaptações. As amostras de soro também foram diluídas 1:100 em BSA 0,5% em PBS-T e adicionadas na placa 100 μL /poço e incubadas a 37 °C por 1 h. Após, os poços foram lavados três vezes com PBS-T e incubados com 100 μL /poço de anti-humano IgG (polivalente) conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), que foi diluído 1:30000 em BSA 0,5% em PBS-T a 37 °C durante 1 h, depois a placa foi lavada três vezes com PBS-T. Após a incubação, a detecção colorimétrica foi feita por solução de OPD (0,2 mg/mL em tampão citrato, pH 5,2) com 2 μL de peróxido de hidrogênio com 100 μL /poço. A reação então foi incubada por 20 min no escuro em temperatura ambiente e interrompida com 30 μL de ácido sulfúrico 2M. A OD492 foi determinada por espectrofotômetro de placa SpectraMax M3 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA).

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism, versão 8.0.1. As diferenças dos grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. As Curvas do Operador Receptor (ROC) foram determinadas e a Área Sob a Curva (AUC) foi calculada individualmente para determinar a sensibilidade (Se), especificidade (Es) e acurácia para o sorodiagnóstico de LT e LV com intervalos de confiança (IC) usando 95% nível de confiança (IC 95%) e analisar o desempenho dos conjugados pept1-NPSPMs/PEG na diferenciação de amostras positivas de negativas. Um valor de corte foi determinado considerando a média de amostras de controle negativo (indivíduo não infectado) mais 3 DP (Desvio

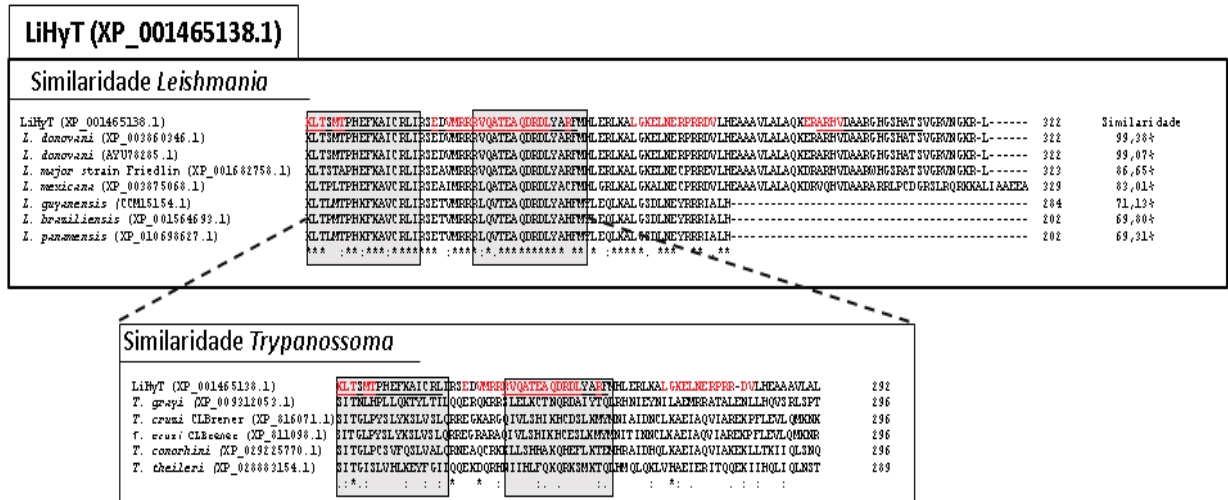
Padrão) para diferenciar amostras negativas de positivas contra pept1-NPSPMs/PEG testadas como antígeno.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DE ANTÍGENO

Por meio de ferramentas de bioinformática, foi selecionada uma das 17 proteínas hipotéticas de *L. infantum*: LiHyT (XP_001465138.1), descrita anteriormente por Coelho et al., 2012. Essa proteína demonstrou ser conservada entre as principais espécies de *Leishmania* e pouco conservada em outras espécies de *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Mycobacterium*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* e *Toxoplasma* (Figura 5). A partir desta proteína, foram preditos dois melhores epítomos de células B e a partir disso selecionou-se o pept1 por apresentar regiões epitópicas de possível resposta a linfócitos B, boa solubilidade em água e em sua sequência apresentar o aminoácido cisteína (Tabela 1). A cisteína poderia desempenhar um papel importante na associação com NPSPMs devido à sua ligação mediada pelo grupo tiol, o que já foi demonstrado por Scussel et al. (2022) para imunodiagnóstico.

Figura 5 - Alinhamento e predição dos epítomos de células B da proteína LiHyT.



FONTE: O autor (2022).

Tabela 1 - A sequência peptídica de acordo com a posição do aminoácido da proteína LiHyT

Peptídeo	Proteína origem	Origem aa	Final aa	Sequência peptídeo	Solubilidade e H ₂ O	Presença Cisteína
Pept1	LiHyT*	221	236	KLTSMTPEHFKAIC RL	Boa	Sim
Pept2	LiHyT*	245	261	RVQATEAQDRDLY ARF	Boa	Não

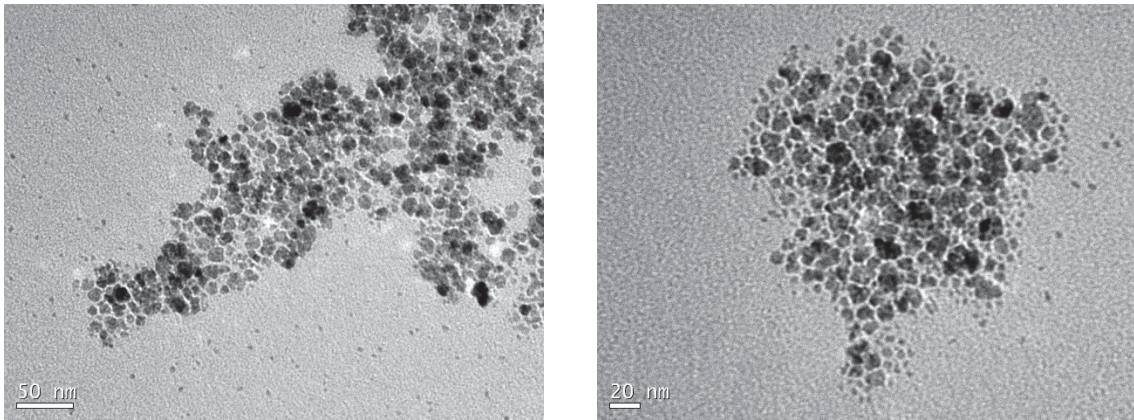
* Sequência de Referência NCBI: (XP_001465138.1)

FONTE: O autor (2022).

4.2 FUNCIONALIZAÇÃO DE CISTEÍNA EM NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO

Para validar a conjugação de polietilenoglicol e cisteína em nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro foram analisadas as características físico-químicas das partículas. Para mimetizar as possíveis interações de peptídeos e NPSPMs, toda a caracterização foi realizada com cisteína-NPSPMs. A Figura 6 mostra imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para a amostra conjugada com PEG. As partículas apresentaram uma forma esférica, distribuição de tamanho uniforme e boa dispersão. A adição de polietilenoglicol nesses sistemas atua como agente estabilizador e dispersante, produzindo nanopartículas bem definidas, homogêneas e de menor tamanho (Figura 6B) quando comparadas às NPSPMs não funcionalizadas (Figura 6A).

Figura 6 - Imagens TEM



- A- Nanopartículas superparamagnéticas (NPSPMs) não funcionalizadas com PEG;
 B- Nanopartículas superparamagnéticas (NPSPMs) funcionalizadas com PEG.

Como demonstrado na Tabela 2 um aumento no diâmetro hidrodinâmico de 34 nm para 50 nm foi observado quando a cisteína foi conjugada com NPSPMs. Esse aumento provavelmente está relacionado à formação de uma camada de revestimento de cisteína na superfície das NPSPMs. Nas nanopartículas conjugadas com PEG, observou-se uma redução no tamanho hidrodinâmico quando funcionalizada. Outra propriedade importante para confirmar a conjugação de cisteína e polietilenoglicol em NPSPMs e sua estabilidade é a análise do potencial zeta. Cis-NPSPMs apresentaram um potencial zeta de 18 mV, e o valor positivo mostrado está relacionado à protonação de grupos amino e carboxílicos na superfície das NPSPMs (ASHOUR et al., 2016). Modificações no potencial zeta e tamanho das nanopartículas indicam conjugação de cisteína bem-sucedida na superfície de NPSPMs funcionalizadas (BAGBI et al., 2017).

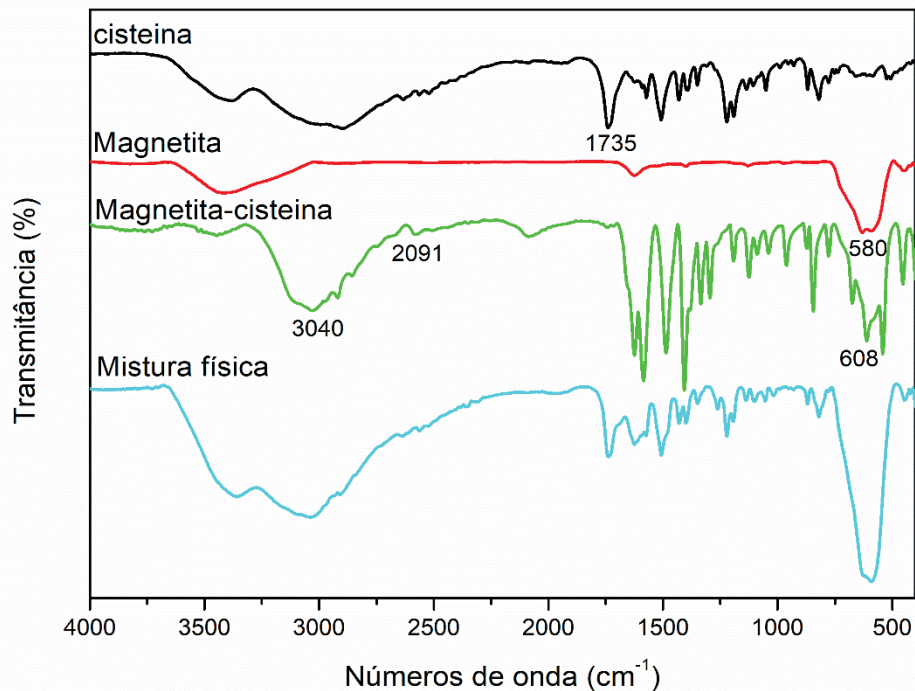
Tabela 2 - Raio hidrodinâmico (RH), índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta (mV).

Amostras	$2R_H$ (nm)	PDI	ξ (Mv)
NPSPMs	34 ± 5	> 0.2	$- 28 \pm 3$
NPSPMs + Cis	50 ± 4	> 0.2	18 ± 4
NPSPMs + PEG	30 ± 5	> 0.2	$- 28 \pm 3$

A Figura 7 mostra os espectros de FTIR de amostras funcionalizadas com polietilenoglicol, cisteína e NPSPMs não revestidas. Como pode ser visto, as NPSPMs

não revestidas, apenas com a característica de magnetita, possuem picos característicos em 580 cm^{-1} atribuídos à fase magnetita e picos em 1630 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} referentes ao alongamento de vibração $-\text{OH}$ das moléculas de água (TAI; LAI; ABDUL HAMID, 2016). O espectro correspondente às nanopartículas de PEG-NPSPMs, representando a mistura física, apresenta picos característicos de todos os elementos, com destaque para o pico obtido em 1633 cm^{-1} atribuído ao alongamento da banda $-\text{OH}$ e vibração de alongamento assimétrico de carboxilato (COO^-) e o pico de 1403 cm^{-1} atribuído à vibração $\text{C}-\text{H}$. Esses picos evidenciam que as superfícies das NPSPMs foram revestidas com PEG (Bagbi et al. 2017). O espectro correspondente às nanopartículas cis-NPSPMs apresenta um pico em 608 cm^{-1} atribuído à vibração da ligação $\text{Fe}-\text{O}$ das nanopartículas Fe_3O_4 . Um pico mais largo observado em 3040 cm^{-1} está relacionado ao alongamento $\text{N}-\text{H}$ e $\text{O}-\text{H}$ (FEUSER et al., 2020). Os picos em 1197 cm^{-1} e 1118 cm^{-1} podem ser atribuídos às ligações $\text{C}-\text{N}$ e $\text{C}-\text{O}$. Um pico mais fraco em 2577 cm^{-1} pode estar relacionado à presença do grupo tiol ($\text{S}-\text{H}$) (MEEROD et al., 2008). No espectro FTIR da cisteína pura, há um pico mais intenso em 1735 cm^{-1} , relacionado ao alongamento simétrico de $\text{C}=\text{O}$ (ASHOUR et al., 2016). Esse pico no espectro de cis-NPSPMs desaparece, essa mudança pode ser uma indicação de que a cisteína está se ligando a NPSPMs através de grupos carboxílicos. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que polietilenoglicol e cisteína foram funcionalizados com sucesso em NPSPMs.

Figura 7 - Análise FTIR



4.3 ESTUDO DE ACURÁCIA PARA AVALIAÇÃO DE UM ANTÍGENO PARA NANO SORODIAGNÓSTICO DE LT, LV E LV/HIV

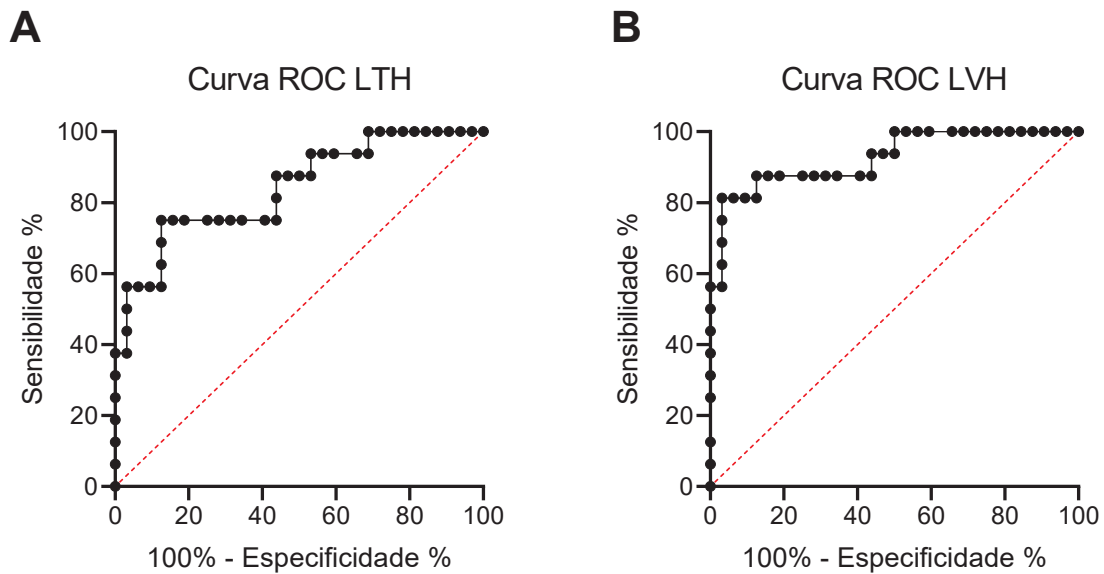
O método da curva ROC foi aplicado para determinar o desempenho da Área Sob a Curva (AUC) com base na sensibilidade e especificidade do ELISA baseado em nanopeptídeos como diagnóstico de leishmaniose. O valor da AUC determina a precisão do modelo na diferenciação entre amostras positivas e negativas. Um modelo tem medida apropriada quando a AUC está próxima de 1. As curvas ROC LTH e LVH foram mostradas na Figura 8A e B, respectivamente, e a Tabela 3 mostra os parâmetros das curvas ROC. Pept1-NPSPMs/PEG como antígeno para LTH exibiram $AUC \geq 0,80$, comprovando bom desempenho, com sensibilidade de 75% e especificidade de 87,50% (Fig. 8A e Tab. 3) e foram capazes de detectar e diferenciar a maioria das amostras positivas e negativas. Os mesmos pept1-NPSPMs/PEG como antígeno para LVH apresentaram melhores resultados exibindo $AUC \geq 0,92$, comprovando excelente desempenho, com sensibilidade e especificidade de 87,50% (Fig. 8B e Tab. 3) e foram capazes de detectar e diferenciar todas as coinfeções LV/HIV positivas e amostras negativas. Amostras de soro de pacientes com leishmaniose e de doadores não infectados ($n = 18$), foram usadas em ELISA baseado

em peptídeo nanomagnético para determinar a Sensibilidade (Se), Especificidade (Es), Intervalo de Confiança (95% IC) e Área Sob o Curva (AUC) por análise da curva ROC.

Tabela 3 - Parâmetros da análise ROC do ELISA baseado em peptídeo nanomagnético para detecção específica de IgG usando pept1- NPSPMs/PEG como antígeno para sorodiagnóstico de LTH e LVH.

Parâmetros							
Doenças	ACU	P valor	Cut-off	Se (%)	95% IC	Es (%)	95% IC
LTH	0.8398	<0.0001	< 2.064	75.00	50.50 - 89.82	87.50	71.93 - 95.03
LVH	0.9258	<0.0001	< 2.064	87.50	63.98 - 97.78	87.50	71.93 - 95.03

Figura 8 - Determinação das curvas ROC



A- Determinação das curvas ROC da leishmaniose tegumentar humana (LTH);

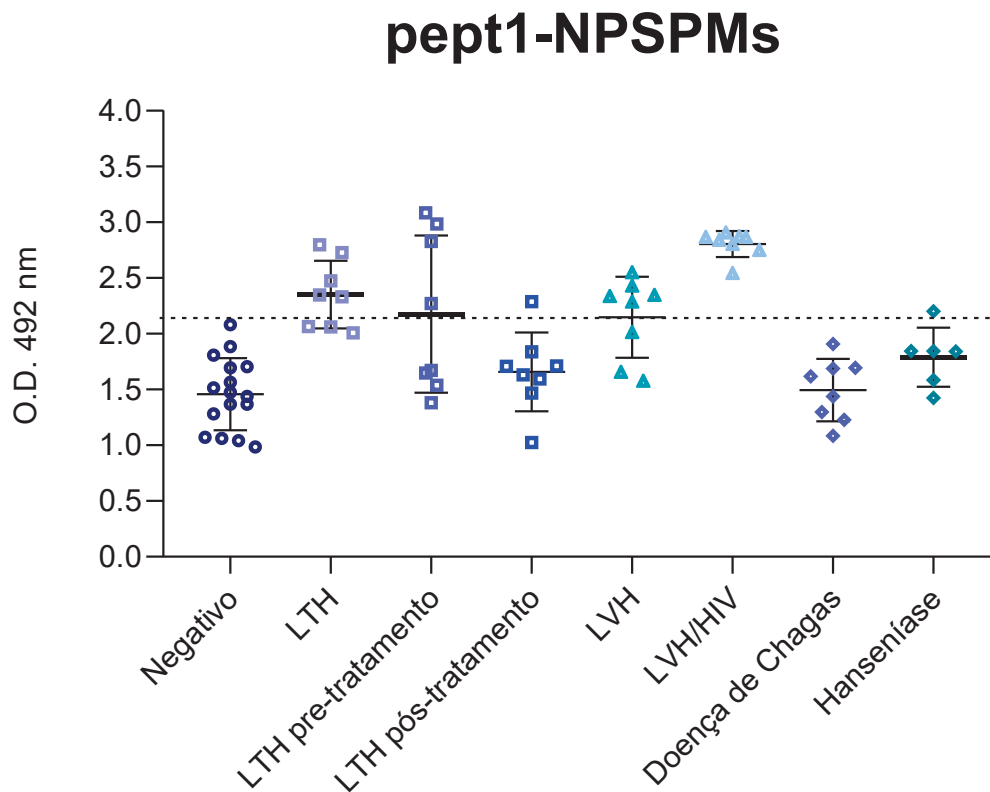
B- Determinação das curvas ROC da leishmaniose visceral humana (LVH).

4.4 SORODIAGNÓSTICO ELISA BASEADO EM PEPTÍDEOS USANDO NANOMATERIAIS

Avaliou-se a reatividade do peptídeo sintético associado a nanopartículas superparamagnéticas/PEG contra um painel sorológico humano. Foram incluídos soros de indivíduos com LTH, LT/pré-tratamento, LT/pós-tratamento, LVH, coinfeção

LV/HIV, indivíduos saudáveis e soros de indivíduos infectados com doença de chagas e hanseníase. O peptídeo 1 associado foi avaliado como antígeno, frente as amostras sorológicas, os resultados com os valores de absorbância demonstrando a reatividade desse antígeno são representados na Figura 9. Por meio do *cut-off* é possível observar que houve diferenciação entre amostras positivas e negativas. O *cut-off* para determinar as amostras detectadas como negativos (indivíduos saudáveis, infectados por outras doenças associadas e pós-tratamento) e positivos (soros de pacientes com LTH, LVH e LV/HIV) foram determinados por meio de curvas ROC, demonstrando a sensibilidade e especificidade do peptídeo. O conjugado anti-IgG humano foi diluído 1:10000 em 0,5% BSA em PBS-T.

Figura 9 - Reatividade sorológica utilizando peptídeo sintético associado a nanopartículas superparamagnéticas como antígeno para o sorodiagnóstico de LT e LV.



* Os círculos azuis escuros representam os valores de densidade óptica para cada amostra negativa.

* Esses valores foram usados para determinar as Curvas de Operador de Receptor (ROC) para LTH e LVH.

5 DISCUSSÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias, caracterizada por ser uma doença tropical e subtropical causada por um parasito intracelular transmitido ao homem pela picada do flebotomíneo infectado com o parasito *Leishmania*. Ela representa um grave problema de saúde pública mundial que apresenta amplo espectro de manifestações clínicas com desfecho potencialmente fatal (ARENAS et al., 2017; DESJEUX, 2004).

Em virtude do cenário da leishmaniose no Brasil e no mundo faz-se necessário a adoção de políticas de controle que busquem medidas de profilaxia eficazes, diagnósticos eficientes e tratamento adequado aos indivíduos infectados (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996). Para um diagnóstico eficiente é preciso levar em consideração aspectos clínicos e epidemiológicos associados com testes laboratoriais. Sendo assim, existem várias metodologias a serem utilizadas para tal finalidade, porém cada método de diagnóstico laboratorial possui vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas e muitas vezes aprimoradas (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

O atual diagnóstico das leishmanioses apresenta diversas dificuldades de aplicabilidade e de inconformidades de resultados, porém ainda o exame parasitológico através da microscopia é considerado padrão-ouro, o qual consiste na busca por formas amastigotas em amostras de aspirados do baço, medula óssea, linfonodos ou raspados de lesões (GALVANI et al., 2022). Entretanto, o método parasitológico apresenta dificuldade para a coleta de amostras, que é considerada invasiva e há variações quanto a sua sensibilidade e/ou especificidade dependendo do parasitismo do paciente para visualização das formas amastigotas na amostra coletada (MACHADO et al., 2020; VALE et al., 2022).

Os testes sorológicos vêm complementando a microscopia no diagnóstico da leishmaniose há muitos anos; no entanto, eles ainda não podem substituir totalmente o diagnóstico microscópico. Esses ensaios baseiam-se na detecção de antígenos ou anticorpos de amostras de pacientes. Os testes de diagnóstico rápido tornaram-se alguns dos ensaios baseados em sorologia mais populares (PEELING; SMITH; BOSSUYT, 2006; RICCIARDI; NDAO, 2015). Nesse contexto, o diagnóstico preciso desse complexo de doenças é essencial para realizar um tratamento rápido visando a melhoria da qualidade de vida dos pacientes, e os testes sorológicos têm sido

considerados ferramentas importantes para o diagnóstico da leishmaniose, devido à sua simplicidade, alta performance, reprodutibilidade e baixo custo (COSTA et al., 2016). O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é uma das técnicas mais utilizadas no imunodiagnóstico através da detecção de proteínas, peptídeos e outras biomoléculas para quantificá-los (KHODADADI et al., 2021a). O uso de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos para o diagnóstico da leishmaniose é promissor, pois proporciona reprodutibilidade do teste devido à estabilidade dessas moléculas e independe do processamento de parasitas vivos como antígenos (FARIA et al., 2015).

Contudo, um bom antígeno deve primeiramente ser reconhecido pelo sistema imunológico. Desta forma deve existir uma ligação molecular específica com uma interação complementar das bases, entre a região de ligação do receptor de células B ou T e uma porção do antígeno, conhecido como epítipo. Tal interação resulta na ativação de uma resposta imune específica contra o antígeno. Os linfócitos B que fazem este reconhecimento passam a produzir anticorpos específicos, sendo que esta interação com antígenos ocorre quando estes estão livres em solução. Sendo assim, epítopos para fins de diagnóstico normalmente se referem a epítopos reconhecidos por linfócitos B (SAHA; RAGHAVA, 2006).

Nesse cenário, se faz necessário a busca por novas alternativas de diagnóstico para leishmaniose focadas em solucionar os problemas relacionados à baixa sensibilidade e/ou especificidade dos testes atuais. Além disso, os estudos devem focar em alternativas para testes mais rápidos, de fácil execução e com preço acessível. Vários kits de diagnóstico vêm sendo desenvolvidos e lançados no mercado baseados nas técnicas de imunocromatografia ou de ELISA (LIMA et al., 2017; OSWALDO CRUZ et al., 2021; RODRIGUES et al., 2019).

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem se inserido na área da medicina com foco no desenvolvimento de sistema de liberação de fármacos alvo (HA et al., 2018) e aprimoramento de plataformas de diagnóstico (ZHANG et al., 2019). As propriedades das nanopartículas as tornam atrativas para uma aplicação biomédica em nanodiagnóstico como uma plataforma portátil, robusta e de baixo custo para detecção de diversos antígenos (SINGH et al., 2018). As nanopartículas superparamagnéticas (NPSPMs) estão entre os nanomateriais mais utilizados na busca de aplicações em novas plataformas de diagnóstico devido às suas propriedades magnéticas, proporcionando uma separação rápida quando expostas a um campo magnético externo (SINGH; SAHOO, 2014).

No presente estudo, nanopartículas superparamagnéticas funcionalizadas com PEG foram associadas a um peptídeo solúvel projetado a partir de epítomos lineares de células B de proteínas de *Leishmania* (GALVANI et al., 2021, 2022) que se mostraram anteriormente antigênicas para LT e LV (LIMA et al., 2017). Esta associação foi utilizada como antígeno e suporte em um ELISA magnético contra a leishmaniose.

As nanopartículas magnéticas (NPMs) encontraram muitas aplicações nas áreas de bioensaio, bioseparação e entrega de drogas devido aos seus méritos notáveis, incluindo grande proporção de área de superfície para volume, baixo custo de síntese, suscetibilidade magnética, baixa toxicidade e compatibilidade com biomateriais (LIANG et al., 2016). Foi demonstrado por Tai et al., (2016) que as NPMs quando revestidas por outros materiais como polietilenoglicol, quitosana, lipídeos e proteínas, sua estabilidade é aumentada e expande as aplicações através da integração de mais funcionalidades.

Apresentando alta relação área-volume, as nanopartículas de óxido de ferro apresentam tendência à aglomeração e sorção de proteínas do sangue, de modo que a associação de nanopartículas superparamagnéticas com PEG (Polietilenoglicol) é uma alternativa para estabilização e desagregação causada por moléculas de magnetita, facilitando a ligação ao grupo tiol da cisteína presente no peptídeo utilizado (Figura 6,7 e Tabela 2) (SHIMANOVSKII, 2014).

Os peptídeos permitem um melhor reconhecimento de anticorpos específicos, reduzindo as chances de reações cruzadas, melhorando o desempenho dos testes diagnósticos. Um peptídeo que desempenha um papel de um bom candidato a antígeno para diagnóstico deve conter sua sequência conservada no gênero *Leishmania* (Figura 5) dando mais sensibilidade ao teste, e regiões pouco conservadas em *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Mycobacterium*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* e *Toxoplasma*, tornando-o mais específico e com menos reações cruzadas. As reações cruzadas têm sido descritas na literatura como a principal desvantagem dos testes sorológicos ELISA (FELICIANO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018).

O uso do pept1 conjugado a NPSPMs/PEG como suporte antigênico na nanoplataforma de ELISA apresentou alto desempenho e foi capaz de diferenciar amostras com verdadeiros positivos de verdadeiros negativos. Em relação a LTH apresentou AUC $\geq 0,80$, com sensibilidade de 75% e especificidade de 87,50%. O

mesmo pept1-NPSPMs/PEG como antígeno para LVH apresentou os melhores resultados com $AUC \geq 0,92$, demonstrando excelente desempenho, com sensibilidade e especificidade de 87,50%, sugerindo assim um potencial papel diagnóstico do novo antígeno no diagnóstico da leishmaniose.

Os resultados no estudo de acurácia diagnóstica apresentaram uma melhora no desempenho do sorodiagnóstico em relação aos resultados obtidos no ELISA convencional realizado por Galvani et al., (2022). Sobre a acurácia diagnóstica da LTH no teste nanomagnético, a AUC foi de 0,8398 com sensibilidade 75% (95CI% 50,50 - 89,82) e especificidade 87,50% (95CI% 71,93 - 95,03), enquanto para o pept1 no sorodiagnóstico ELISA convencional, validado com as mesmas amostras, a AUC foi de 0,694 com sensibilidade de 25,5% (95CI% 14,7–39,0) e especificidade de 98,3% (95CI% 0,601–0,787) para LTH. Isso demonstra que a nanoplataforma foi capaz de promover um avanço substancial na realização do diagnóstico, pois a AUC foi de 0,694 até 0,8398.

A AUC é uma medida da precisão de um teste diagnóstico; assim, os valores de AUC indicam o desempenho do teste. Os valores de AUC possíveis variam de 0,5, para linha diagonal de 45°, sem capacidade de diagnóstico, a 1,0, a capacidade de diagnóstico perfeita (SCUSSEL et al., 2022). O valor de AUC, 0,8398, apresentado pela nanoplataforma, está muito mais próximo da capacidade diagnóstica ideal, refletindo uma proporção melhor de previsões corretas. Já a sensibilidade (Se) diz respeito à predição de verdadeiros positivos, portanto, quanto maior a sensibilidade, maior o potencial do teste em detectar a doença. Por outro lado, a especificidade (Es) está relacionada à probabilidade de o teste estar correto quando a doença está ausente, pois detecta verdadeiros negativos. Uma alta especificidade significa que é improvável que o teste indique um falso positivo (HABIBZADEH; HABIBZADEH; YADOLLAHIE, 2016; KING; ECKERSLEY, 2019).

As distintas manifestações clínicas da LTH, como leishmaniose cutânea (LC) ou leishmaniose mucosa (LM), tendem a apresentar baixos níveis de anticorpos anti-leishmania nos testes sorológicos comerciais. Também no estudo de Galvani et al., (2022) o pept1 como antígeno de revestimento em ELISA convencional, apresentou baixa sensibilidade para detectar LT, com a sensibilidade de 25,5% (95CI% 14,7–39,0). A plataforma nanomagnética de ELISA aplicada ao pept1 poderia melhorar a sensibilidade de 25,5% (95CI% 14,7–39,0) no ELISA convencional para 75% (95CI% 50,50 - 89,82), levando a avanços na detecção da doença. Resultados sorológicos em

outros trabalhos avaliando antígenos para o diagnóstico de LTH são limitados devido à variável sensibilidade e especificidade dos testes, influenciada pela escolha do antígeno sugerindo então a importância do desempenho do antígeno para melhor diagnóstico da doença (COELHO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018).

Os testes imunológicos também são os métodos aplicados que podem detectar a doença em seus estágios iniciais antes do início do tratamento. No entanto, em áreas endêmicas, geralmente o teste sorológico não é capaz de diferenciar uma doença ativa de uma anterior, pois os níveis de sorologia permanecem positivos devido à infecção subclínica. O que dificulta a aplicação destes em fins prognósticos (SRIVIDYA et al., 2012). O pept1 como antígeno em plataforma nanomagnética foi capaz de avaliar o desempenho prognóstico mostrando que os anticorpos IgG antileishmania diminuíram em níveis significativos em pacientes com LTH, quando a reatividade sorológica foi comparada antes e após o tratamento (Figura 9), sugerindo um potencial desta plataforma para melhorar o prognóstico de doença.

Em relação à acurácia diagnóstica nanomagnética da LVH o estudo apresentou alto desempenho, a AUC foi de 0,9258 com sensibilidade de 87,50% (95CI% 63,98 - 97,78) e especificidade 87,50% (95CI% 71,93 - 95,03). O pept 1 no sorodiagnóstico de LVH com ELISA convencional realizado para as mesmas amostras, a AUC foi 0,98 com sensibilidade 98,4 (95CI% 94,3–99,8) e especificidade 81,4% (95CI% 70,3–89,7) (GALVANI et al., 2021). Os resultados deste estudo mostram que há a manutenção do alto desempenho do pept1 como antígeno para sorodiagnóstico de LVH, pois há uma diminuição da sensibilidade, 98,4 (95CI% 94,3–99,8) do ELISA convencional para 87,50% (95CI% 63,98 - 97,78) do ELISA nanomagnético, enquanto há aumento de especificidade de 81,4% (95CI% 70,3–89,7) do ELISA convencional para 87,50% (95CI% 71,93 - 95,03) do ELISA nanomagnético.

Um desafio adicional para o diagnóstico de LVH são os pacientes coinfectados pelo HIV, uma vez que a coinfeção é comum nos mesmos países onde ambas as doenças são endêmicas. O HIV infecta as células CD4, e a diminuição da contagem de células T afeta as células B e os macrófagos, levando à disfunção do sistema imunológico e à imunossupressão. Pode reduzir a sorologia antileishmania em pacientes coinfectados e diminuir a sensibilidade dos testes. Pacientes coinfectados também são potenciais disseminadores da *Leishmania*, promovendo um enorme problema para as atuais estratégias de eliminação (BOTANA et al., 2019; KAZER; WALKER; SHALEK, 2020; LINDOSO et al., 2018). A incidência global de

coinfecção relatada é subestimada, em parte porque a LV ocorre em populações negligenciadas e por não estar na lista de infecções oportunistas, portanto, dificilmente é relatada nos sistemas de notificação de AIDS (BRASIL, 2015).

Os resultados apresentaram melhor desempenho para detectar e diferenciar a coinfecção LV/HIV positiva de amostras negativas, como mostrado na Figura 9. O alto nível de anticorpos anti-leishmania em pacientes com coinfecção LV/HIV presentes nos resultados apresentados podem ser devido a uma forte resposta humoral produzida por hiperproteinemia característica observada em pacientes infectados pelo HIV. Mesmo em estágios avançados, dependendo do momento de aquisição dos dois agentes infecciosos, a produção de anticorpos anti-leishmania pode ser preservada (ALVAR et al., 2008; FERNÁNDEZ COTARELO et al., 2003). Diante da coinfecção LV/HIV de detecção de anticorpos anti-leishmania, a plataforma nanomagnética também demonstrou atuação efetiva no sorodiagnóstico para a mesma.

Por outro lado, a vantagem referente ao uso da plataforma nano comparada a plataformas convencionais é relacionada ao tempo de aplicação da técnica, sendo que o ELISA nanomagnético é realizado sem revestimento durante a noite e etapas de bloqueio, diminuindo o tempo total de processamento do ensaio (OH et al., 2018; SCUSSEL et al., 2022). Em relação ao custo, a plataforma nano descrita nesse trabalho apresenta outra vantagem por possuir um custo menor, mesmo quando comparada a outros ELISA nanomagnéticos, como o relatado por Oh et al., (2018) em que foi em torno de US\$ 3,00 por amostra, enquanto o método aqui descrito custa em torno de US\$ 0,5 por amostra. Além disso a plataforma nanomagnética dispensa a utilização de placa ELISA de 96 poços de alta ligação que custam cerca de US\$ 7,33 por placa, uma placa de 96 poços custa US\$ 0,59, diminuindo significativamente o tempo e custo da técnica sorológica.

O uso de peptídeos como antígeno também é uma alternativa economicamente viável por serem fáceis de sintetizar, armazenar e a longo prazo a plataforma magnética poderá ser ainda mais barata. A biotecnologia peptídica, por meio de ferramentas de bioinformática, possibilitou a determinação de regiões de epítomos, possibilitando melhorar a especificidade e sensibilidade do teste, evitando reações cruzadas devido à semelhança entre antígenos de outras doenças, como doença de chagas e hanseníase (Fig. 9) (LAGE et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018). O uso dos peptídeos sintéticos associados às nanopartículas magnéticas funcionalizadas com PEG, como antígeno de cobertura do teste ELISA

nanomagnético aumentou a sensibilidade e principalmente a especificidade do método potencializando assim seu poder de distinção de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos no diagnóstico das Leishmanioses, aumentando a eficiência desta metodologia.

Portanto, este trabalho demonstrou que a metodologia proposta para o desenvolvimento de uma plataforma nanotecnológica para o sorodiagnóstico da leishmaniose baseada em peptídeo, demonstrou uma excelente ferramenta na resolução de grandes problemáticas relacionadas a especificidade e sensibilidade de testes sorológicos atuais, verificando um melhor desempenho da técnica ELISA aumentando a confiabilidade do diagnóstico para o manejo das leishmanioses.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi proposto uma nova alternativa de diagnóstico sorológico para leishmaniose utilizando nanopartículas magnéticas associadas a um peptídeo solúvel baseado em epítomos específicos de células B na busca por um teste mais sensível, específico e com vantagens quanto a tempo e custo. A associação de biotecnologias e nanotecnologias de peptídeos tem mostrado um grande potencial como antígeno de revestimento em ELISA baseado em peptídeos nanomagnéticos.

O polietilenoglicol e o peptídeo foram funcionalizados com sucesso em NPSPMs e a partir de um processo de síntese rápida e sem esforço é possível desenvolver nanopartículas estáveis com características e propriedades promissoras para aplicação na área de nanodiagnóstico. O ELISA nanomagnético provou ser uma técnica vantajosa, com um processo menos demorado com detecção otimizada do que o ELISA convencional baseado em peptídeos.

Os resultados obtidos podem levar ao uso do antígeno proposto para fins comerciais e levar a novos métodos de nanodiagnóstico no local de atendimento. No entanto, mais estudos são necessários devido ao número de amostras e a falta de informações podendo ser um limitante ao trabalho. Concluindo assim que a metodologia proposta por este trabalho se mostra promissora como uma nova ferramenta a ser utilizada no sorodiagnóstico das Leishmanioses.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497–506, maio 2011.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic Local Alignment Search Tool 2Department of Computer Science. p. 403–410, 1990.
- ALVAR, J. et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334, abr. 2008.
- ARCA-LAFUENTE, S. et al. Nanotechnology: A reality for diagnosis of HCV infectious disease. **Journal of Infection**, v. 80, n. 1, p. 8–15, 1 jan. 2020.
- ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, 2017.
- ASHOUR, R. M. et al. Preparation and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles functionalized by L-cysteine: Adsorption and desorption behavior for rare earth metal ions. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 3, p. 3114–3121, 1 set. 2016.
- BACELLAR, O. E. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. . **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 24–34, 2005.
- BAGBI, Y. et al. Lead and Chromium Adsorption from Water using L-Cysteine Functionalized Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 9 ago. 2017.
- BEKHIT, A. A. et al. Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 160, p. 229–244, 5 dez. 2018.
- BOTANA, L. et al. Asymptomatic immune responders to Leishmania among HIV positive patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 6, 1 jun. 2019.
- BRASIL, M. D. S. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. 1° ed. Brasília - DF: [s.n.].
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15 set. 2018.
- CIAURRIZ, P. et al. Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Beilstein Journal of Nanotechnology 8:27**, v. 8, n. 1, p. 244–253, 25 jan. 2017.
- COELHO, E. A. F. et al. Evaluation of two recombinant Leishmania proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and

- human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 215, p. 63–71, 15 jan. 2016.
- COELHO, V. T. S. et al. Identification of Proteins in Promastigote and Amastigote-like Leishmania Using an Immunoproteomic Approach. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1430, jan. 2012a.
- COSTA, L. E. et al. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, v. 434, p. 39–45, 1 jul. 2016.
- DAHIYA, B.; K MEHTA, P. Utility of nanoparticle-based assays in the diagnosis of tuberculosis. **Nanomedicine**, 14 maio 2021.
- DE SOUZA, D. K. et al. Diagnosis of neglected tropical diseases during and after the COVID-19 pandemic. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008587, 14 ago. 2020.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 1 maio 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, set. 2004.
- DUARTE, M. C. et al. Performance of Leishmania braziliensis enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 77–81, 30 abr. 2017.
- ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 961–972, 2014.
- EMINI, E. A. et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, v. 55, n. 3, p. 836, set. 1985.
- FABER, W. R. et al. Cutaneous Leishmaniasis Acquired in Jura, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 183, jan. 2012.
- FARAHMAND, M.; NAHREVANIAN, H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. **Iranian biomedical journal**, v. 20, n. 3, p. 128–134, 2016.
- FARIA, A. R. et al. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic Leishmania infantum-Infected Dogs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3429, 2015.

- FELICIANO, N. D. et al. Short epitope-based synthetic peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **Immunology Letters**, v. 172, p. 89–93, 1 abr. 2016.
- FERNÁNDEZ COTARELO, M. J. et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 37, n. 7, p. 973–977, 1 out. 2003.
- FEUSER, P. E. et al. In vitro cytotoxicity and hyperthermia studies of superparamagnetic poly(urea-urethane) nanoparticles obtained by miniemulsion polymerization in human erythrocytes and NIH3T3 and HeLa cells. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1725763>, v. 70, n. 7, p. 476–485, 2020.
- GALVANI, N. C. et al. ChimLeish, a new recombinant chimeric protein evaluated as a diagnostic and prognostic marker for visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus coinfection. **Parasitology Research**, v. 120, n. 12, p. 4037–4047, 1 dez. 2021.
- GALVANI, N. C. et al. Sensitive and specific serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis using a new chimeric protein based on specific B-cell epitopes of Leishmania antigenic proteins. **Microbial Pathogenesis**, v. 162, 1 jan. 2022.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.10.19>, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2014.
- GOYAL, D. K.; KESHAV, P.; KAUR, S. Potential of TLR agonist as an adjuvant in Leishmania vaccine against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 105021, 1 set. 2021.
- GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R. D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, n. 1–2, p. 23–41, 30 maio 2000.
- GYE, H. J.; NISHIZAWA, T. Reproducibility of antigen-immobilized enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and sandwich ELISA for quantitative detection of NNV particles. **Journal of Virological Methods**, v. 275, p. 113754, 1 jan. 2020.
- HA, Y. et al. Recent Advances Incorporating Superparamagnetic Nanoparticles into Immunoassays. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 2, p. 512–521, 23 fev. 2018a.

- HABIBZADEH, F.; HABIBZADEH, P.; YADOLLAHIE, M. On determining the most appropriate test cut-off value: the case of tests with continuous results. **Biochemia medica**, v. 26, n. 3, p. 297–307, 1 out. 2016.
- HU, R.; SOU, K.; TAKEOKA, S. A rapid and highly sensitive biomarker detection platform based on a temperature-responsive liposome-linked immunosorbent assay. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 22 out. 2020.
- KAZER, S. W.; WALKER, B. D.; SHALEK, A. K. Evolution and Diversity of Immune Responses during Acute HIV Infection. **Immunity**, v. 53, n. 5, p. 908–924, 17 nov. 2020.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 1 jul. 2015.
- KHODADADI, A. et al. Development of Nano-ELISA method for serological diagnosis of toxoplasmosis in Mice. **Archives of Razi Institute**, v. 75, n. 4, p. 419–426, 2021a.
- KING, A. P.; ECKERSLEY, R. J. Descriptive Statistics III: ROC Analysis. **Statistics for Biomedical Engineers and Scientists**, p. 57–69, 2019.
- LAGE, D. P. et al. A new Leishmania-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, p. 1649–1658, 1 abr. 2016a.
- LAMMIE, P. et al. DIAGNOSTIC NEEDS FOR NTD PROGRAMS. 2011.
- LAURENT, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064–2110, jun. 2008.
- LIANG, X. et al. Direct competitive chemiluminescence immunoassays based on gold-coated magnetic particles for detection of chloramphenicol. **Luminescence**, v. 31, n. 1, p. 168–172, 1 fev. 2016.
- LIMA, B. S. S. et al. A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 174–181, 16 jan. 2017a.
- LIMA, M. P. et al. Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. **Parasitology Research**, v. 116, n. 4, p. 1197–1206, 1 abr. 2017b.

- LINDOSO, J. A. L. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 10, p. 193–201, 15 out. 2018.
- MACHADO, A. S. et al. A *Leishmania infantum* hypothetical protein evaluated as a recombinant protein and specific B-cell epitope for the serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 203, p. 105318, 1 mar. 2020a.
- MACHADO, A. S. et al. A new *Leishmania* hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease. **Experimental Parasitology**, v. 216, p. 107941, 1 set. 2020b.
- MACHADO DE AVILA, R. A. et al. Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1640–1646, ago. 2011.
- MBEH, D. A. et al. In vitro biocompatibility assessment of functionalized magnetite nanoparticles: Biological and cytotoxicological effects. **J Biomed Mater Res Part A**, v. 100, p. 1637–1646, 2012.
- MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, jan. 2013.
- MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of *Leishmania*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102913>, v. 65, p. 543–561, 22 set. 2011.
- MEDEIROS, S. F. et al. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 139–161, 17 jan. 2011.
- MEEROD, S. et al. Magnetite nanoparticles stabilized with polymeric bilayer of poly(ethylene glycol) methyl ether-poly(ϵ -caprolactone) copolymers. **Polymer**, v. 49, n. 18, p. 3950–3956, 26 ago. 2008.
- MONTALVO, A. et al. 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.
- OH, S. et al. Magnetic Nanozyme-Linked Immunosorbent Assay for Ultrasensitive Influenza A Virus Detection. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 15, p. 12534–12543, 2018.

- OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A. et al. Biotechnological applications from a Leishmania amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, n. May, p. 104283, 2020.
- ORTEGA, G. A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, S.; REGUERA, E. Magnetic paper-based ELISA for IgM-dengue detection. **RSC Advances**, v. 7, n. 9, p. 4921–4932, 2017.
- OSWALDO CRUZ, F. et al. Economic evaluations addressing diagnosis and treatment strategies for neglected tropical diseases: an overview. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 63, 24 maio 2021.
- PEARSON, R. D.; DE QUEIROZ SOUSA, A. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1–13, 1996.
- PEELING, R. W.; SMITH, P. G.; BOSSUYT, P. M. M. A guide for diagnostic evaluations. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 12 Suppl, p. S2-6, dez. 2006.
- PINHEIRO, R. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos , tratamento e profilaxia. **Informa**, v. 16, p. 79–82, 2004.
- POTOCNAKOVA, L.; BHIDE, M.; PULZOVA, L. B. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and in Silico Epitope Prediction. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.
- RIBEIRO, P. A. F. et al. A conserved Leishmania hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 3, p. 196–203, 2018a.
- RICCIARDI, A.; NDAO, M. Diagnosis of parasitic infections: What's going on? **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 6–21, 30 jan. 2015.
- RODRIGUES, M. R. et al. Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant Leishmania infantum Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope. **Journal of Immunological Methods**, v. 474, 1 nov. 2019.
- ROOSEVELT, P. et al. LEISHMANIOSE: Resposta Imune e Mecanismos Antioxidantes de Escape. **Revista De Pesquisa E Extensão Em Saúde**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2007.
- SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. suppl_2, p. W202–W209, 1 jul. 2006.

- SAÚDE, O. P.-A. DA. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, No. 10 (Dezembro 2021). 15 dez. 2021.
- SCHWARZ, N. G. et al. Microbiological laboratory diagnostics of neglected zoonotic diseases (NZDs). **Acta Tropica**, v. 165, p. 40–65, 1 jan. 2017.
- SCUSSEL, R. et al. Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. **ACS applied nano materials**, v. 5, n. 1, p. 642–653, 28 jan. 2022.
- SHIMANOVSKII, N. L. Targeted Transport of Drugs by Iron Oxide Nanoparticles. **Original Russian Text© N.L. Shimanovskii**, v. 84, n. 2, p. 126–145, 2014.
- SINGH, A.; SAHOO, S. K. **Magnetic nanoparticles: A novel platform for cancer theranostics**. **Drug Discovery Today** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2014. . Acesso em: 15 jun. 2021
- SINGH, P. et al. Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, 6 jul. 2018.
- SOLER, M. et al. How Nanophotonic Label-Free Biosensors Can Contribute to Rapid and Massive Diagnostics of Respiratory Virus Infections: COVID-19 Case. **ACS Sensors**, v. 5, n. 9, p. 2663–2678, 25 set. 2020.
- SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1065–1078, mar. 2012.
- SUN, P. et al. Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. **Computational and mathematical methods in medicine**, v. 2013, 2013.
- SUN, P. et al. A novel conformational B-cell epitope prediction method based on mimotope and patch analysis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 394, p. 102–108, 7 abr. 2016.
- TAI, M. F.; LAI, C. W.; ABDUL HAMID, S. B. Facile Synthesis Polyethylene Glycol Coated Magnetite Nanoparticles for High Colloidal Stability. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016a.
- THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, [s.d.].
- URUSOV, A. E. et al. Rapid Immunoenzyme Assay of Aflatoxin B1 Using Magnetic Nanoparticles. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 11, p. 21843, 18 nov. 2014.
- UTZINGER, J. et al. Neglected tropical diseases: Diagnosis, clinical management, treatment and control. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, 22 nov. 2012.

- VALE, D. L. et al. Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 167, p. 105562, 1 jun. 2022.
- VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, jun. 2012.
- WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. ChemInform Abstract: Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. **ChemInform**, v. 40, n. 24, 16 jun. 2009.
- YANG, X.; YU, X. An introduction to epitope prediction methods and software. **Reviews in Medical Virology**, v. 19, n. 2, p. 77–96, 2009.
- ZHANG, L. et al. Rapid, visual detection of *Klebsiella pneumoniae* using magnetic nanoparticles and an horseradish peroxidase-probe based immunosensor. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1061–1071, 1 maio 2019.
- ZHOU, J. et al. A Promising Tool in Serological Diagnosis: Current Research Progress of Antigenic Epitopes in Infectious Diseases. **Pathogens 2022, Vol. 11, Page 1095**, v. 11, n. 10, p. 1095, 25 set. 2022.
- ZUCCA, M.; SAVOIA, D. Current Developments in the Therapy of Protozoan Infections. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 4, 17 mar. 2011.