



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Lilyana Waleska Nunes Albuquerque

**Prototipação de um novo método diagnóstico e avaliação *in vitro* de nova estratégia  
terapêutica para a leishmaniose**

Maceió  
2023

LILYANA WALESKA NUNES ALBUQUERQUE

**Prototipação de um novo método diagnóstico e avaliação *in vitro* de nova estratégia terapêutica para a leishmaniose**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Estudos Clínicos e Laboratoriais em Ciências Médicas.

Orientador: Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz  
Coorientadores: Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira e Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte

Maceió

2023

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

A345p Albuquerque, Lilyana Waleska Nunes.  
Prototipação de um novo método diagnóstico e avaliação *in vitro* de nova estratégia terapêutica para a leishmaniose / Lilyana Waleska Nunes Albuquerque. – 2023.  
114 f. : il.

Orientadora: Aline Cavalcanti der Queiroz.  
Co-orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.  
Co-orientador: Alysson Wagner Fernandes Duarte.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Maceió, 2023.  
Inclui produto educacional.

Bibliografia: f. 106-114.

1. Leishmaniose. 2. Prospecção tecnológica. 3. Testes imunológicos. 4. Acustofluídica. 5. Naftoquinonas. I. Título.

CDU: 616.928.5

## FolhadeAprovação

Lilyana Waleska Nunes Albuquerque

Prototipação de um novo método diagnóstico e avaliação *in vitro* de nova estratégia terapêutica para a leishmaniose

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas.



Documento assinado digitalmente

ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ

Data: 07/03/2023 11:41:08-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Profa. Dra. Aline Cavalcanti deQueiroz**

UFAL / Campus Arapiraca

Orientadora



Documento assinado digitalmente

MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA

Data: 09/03/2023 17:27:19-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira**

UFAL/CampusA. C. Simões

Coorientadora



Documento assinado digitalmente

ALYSSON WAGNER FERNANDES DUARTE

Data: 09/03/2023 20:20:04-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte**

UFAL/CampusArapiraca

Coorientador

**BancaExaminadora:**



Documento assinado digitalmente

JULIANA CELIA DE FARIAS SANTOS

Data: 09/03/2023 16:46:26-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Profa. Dra. Juliana Célia de Farias Santos**

UFAL/CampusA. C. Simões

Examinadora interna à UFAL e ao PPGCM



Documento assinado digitalmente

GLAUBER JOSE FERREIRA TOMAZ DA SILVA

Data: 08/03/2023 09:46:31-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr. Glauber José Ferreira Tomaz da Silva**

UFAL/CampusA. C. Simões

Examinador interno à UFAL e externo ao PPGM

---

**Profa. Dra. Andressa Letícia Lopes da Silva**

UNINASSAU

Examinadora externa à instituição



Documento assinado digitalmente

ANDRESSA LETICIA LOPES DA SILVA

Data: 10/03/2023 07:30:25-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

## RESUMO

O diagnóstico não precoce e de baixa precisão diminui as chances de cura da leishmaniose, visto que os tratamentos disponíveis são limitados, tóxicos e induzem resistência. O objetivo deste trabalho é desenvolver um novo método de imunodiagnóstico para leishmaniose tegumentar, utilizando técnicas acustofluídicas, bem como avaliar a atividade leishmanicida de derivados 1,4-naftoquinonas *in vitro*. Assim, foi realizada uma prospecção tecnológica de novos métodos de imunodiagnóstico para leishmaniose tegumentar. Por conseguinte, foram produzidos antígenos de *Leishmania amazonensis* para aplicação nos testes de desempenho em dispositivo acustofluídico, afim de avaliar a eficiência do imunoensaio co diferentes amostras biológicas. Além disso, foi determinado a citotoxicidade e potencial leishmanicida de derivados 1,4-naftoquinonas e seu potencial leishmanicida contra formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* spp.. A prospecção tecnológica reuniu 11 documentos de patentes, cuja a maioria foram depositadas no Brasil. As patentes avaliadas trazem perspectivas diferentes na utilização dos métodos já existentes. Quanto ao desenvolvimento do novo método diagnóstico, os antígenos produzidos foram eficientemente aprisionados no dispositivo acustofluídico em um intervalo de tempo de até 10 minutos e utilizando um baixo volume de amostra, 5 µL. O padrão de imagem entre amostras negativas e positivas foi muito semelhante e revela uma limitação que a técnica possui em fazer esta diferenciação, uma vez que o dispositivo aglomerou os antígenos em todas as amostras. Nos estudos farmacológicos, os resultados indicaram que todos os derivados de 1,4-naftoquinonas apresentaram potente atividade leishmanicida contra *L. chagasi* e *L. amazonensis*, em especial o JN22 que apresentou IC<sub>50</sub> de 1,64 µg/mL e 5,07 µg/mL, respectivamente, com seletividade superior ou equivalente à anfotericina B, sem causar efeito deletério para os macrófagos. Desta forma, o trabalho trouxe abordagens inovadoras para o desenvolvimento de novas estratégias para diagnóstico e tratamento da doença, porém há a necessidade de continuação dos estudos para superar as limitações observadas nos testes de imunoaglutinação, bem como para determinar a atividade anti-amastigota e o mecanismo de ação do composto JN22.

**Palavras-chave:** Leishmaniose. Prospecção tecnológica. Imunodiagnóstico.

Acustofluídica. Naftoquinonas.

## ABSTRACT

Early and low-precision diagnosis decreases the chances of curing leishmaniasis, since the available treatments are limited, toxic and induce resistance. The objective of this work is to develop a new method of immunodiagnosis for tegumentary leishmaniasis, utilizing acoustofluidic techniques, as well as to evaluate the leishmanicidal activity of 1,4-naphthoquinone derivatives in vitro. Thus, a technological prospection of new methods of immunodiagnosis for tegumentary leishmaniasis was conducted. Therefore, *Leishmania amazonensis* antigens were produced for application in performance tests in acoustofluidic device, in order to evaluate the efficiency of the immunoassay with different biological samples. Furthermore, the cytotoxicity and leishmanicidal potential of 1,4-naphthoquinone derivatives and their leishmanicidal potential against promastigotes of different species of *Leishmania* spp. were determined. The technological prospection brought together 11 patent documents, most of which were deposited in Brazil. The evaluated patents presented different perspectives in the use of existing methods. As for the development of the new diagnostic method, the produced antigens were efficiently trapped in the acoustofluidic device in a time interval of up to 10 minutes and using a low sample volume, 5  $\mu\text{L}$ . The image pattern between negative and positive samples was very similar and reveals a limitation that the technique has in making this differentiation, since the device agglomerated the antigens in all samples. In the pharmacological studies, the results indicated that all 1,4-naphthoquinone derivatives showed potent leishmanicidal activity against *L. chagasi* and *L. amazonensis*, especially JN22, which showed an  $\text{IC}_{50}$  of 1.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 5.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively, with selectivity superior or equivalent to amphotericin B, without causing a deleterious effect on macrophages. In this way, the present research brought innovative approaches for the development of new strategies for diagnosis and treatment of the disease, but there is a need for further studies to overcome the limitations observed in immunoagglutination tests, as well as to determine the anti-amastigote activity and the mechanism of action of the compound JN22.

**Keywords:** Leishmaniasis. Technological prospecting. Immunodiagnosis. Acoustofluidics. naphthoquinones.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Fatores determinantes da saúde.....   | 14 |
| <b>Figura 2</b> - Intervenções de saúde pública recomendadas para o manejo das DN.....  | 15 |
| <b>Figura 3</b> – Flebotomíneo (hospedeiro invertebrado dos parasitos de <i>Leishmania</i> spp.).....   | 16 |
| <b>Figura 4</b> - Formas evolutivas: promastigotas (A e C) e amastigotas (B e D).....   | 18 |
| <b>Figura 5</b> - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.....   | 19 |
| <b>Figura 6</b> - Mecanismos imunológicos na leishmaniose.....  | 22 |
| <b>Figura 7</b> - Leishmaniose cutânea: localizada (A), mucocutânea (B) e difusa (C).....   | 23 |
| <b>Figura 8</b> - Leishmaniose visceral .....   | 24 |
| <b>Figura 9</b> - Situação de endemidade da leishmaniose visceral no mundo, 2020 .....  | 24 |
| <b>Figura 10</b> - Situação de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2020 .....  | 25 |
| <b>Figura 11</b> - Esfregaço por escarificação para demonstração direta do parasito.....  | 26 |
| <b>Figura 12</b> - Abordagens diagnósticas para leishmaniose .....  | 29 |
| <b>Figura 13</b> - Funcionamento do dispositivo de acustofluídica. (a) Esquemático do dispositivo de acustofluídica. (b) Bio-partículas dentro da microcavidade. (c) Biopartículas concentradas com o dispositivo ligado..... | 30 |
| <b>Figura 14</b> - Naftoquinonas clássicas: lapachol e $\beta$ -lapachol.....   | 36 |
| <b>Figura 15</b> - Planejamento estrutural de derivados 1,4-naftoquinônicos.....  | 37 |
| <b>Figura 16</b> – Ensaio de viabilidade celular.....   | 41 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Quadro 1</b> - Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> spp.....   | 17 |
| <b>Quadro 2</b> - Fármacos leishmanicidas mecanismo de ação, regime terapêutico, eficácia clínica, toxicidade e custo..... | 32 |



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>2.1 Objetivo geral.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>2.2 Objetivos específicos.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>3.1 Doenças negligenciadas (DNs).....</b>  | <b>13</b> |
| <b>3.2 Leishmaniose.....</b>  | <b>16</b> |
| 3.2.1 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....   | 18        |
| 3.2.2 Imunopatogênese da leishmaniose.....  | 20        |
| 3.2.3 Classificação e manifestações clínicas.....   | 22        |
| 3.2.4 Situação epidemiológica.....  | 24        |
| <b>3.3 Diagnóstico da leishmaniose.....</b>   | <b>26</b> |
| 3.3.1 Pesquisa e desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico.....   | 27        |
| 3.3.2 Potencial da tecnologia acustofluídica para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico.....  | 29        |
| <b>3.3 Tratamento farmacológico da leishmaniose.....</b>  | <b>31</b> |
| 3.3.1 Potencial leishmanicida das naftoquinonas.....  | 35        |
| <b>4 METODOLOGIA.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>4.1 Prospecção tecnológica de novos métodos de imunodiagnóstico para leishmaniose tegumentar.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>4.2 Desenvolvimento de um novo método de diagnóstico, utilizando tecnologia acustofluídica para diagnóstico da leishmaniose tegumentar.....</b>                    | <b>38</b> |
| 4.2.1 Planejamento e fabricação do dispositivo acustofluídico.....  | 38        |
| 4.2.2 Manutenção da cepa de <i>L. amazonensis</i> .....   | 38        |
| 4.2.3 Preparação de antígenos de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....   | 39        |
| 4.2.4 Coloração de antígenos de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....  | 39        |
| 4.2.5 Armadilhamento de antígenos de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....   | 39        |
| 4.2.6 Avaliação da eficiência do ensaio de imunoaglutinação direta em aparelho acustofluídico, utilizando amostras de saliva, urina, sangue total, soro e plasma..... | 40        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.3 Estudo da avaliação do potencial leishmanicida de derivados de naftoquinonas.....</b> | <b>40</b>  |
| 4.3.1 Obtenção das substâncias.....  | 40         |
| 4.3.2 Manutenção de linhagem de macrófagos.....  | 40         |
| 4.3.3 Determinação da viabilidade celular.....   | 41         |
| 4.3.4 Ensaio de viabilidade de promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....                   | 41         |
| 4.3.5 Análise estatística.....   | 42         |
| <b>5 PRODUTOS.....</b>   | <b>43</b>  |
| <b>5.1 Produto 1.....</b>  | <b>44</b>  |
| <b>5.2 Produto 2.....</b>  | <b>69</b>  |
| <b>5.3 Produto 3.....</b>  | <b>89</b>  |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>103</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>104</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Denomina-se leishmaniose o complexo de doenças causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, da família Tripanossomatidae. Esses protozoários podem causar uma complexidade de manifestações e formas clínicas, que inclui a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2022). O ciclo de vida desses parasitos é complexo, sendo parte no inseto vetor da doença, o flebotomíneo e outra parte no seu hospedeiro vertebrado, humanos e outros animais mamíferos, o que caracteriza a leishmaniose como uma importante zoonose (EFSTATHIOU; SMIRUS, 2021).

No ano de 2019 a leishmaniose passou a ser endêmica em 102 países e territórios, causando a morte de 20 a 30 mil pessoas por ano. Cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas de alto risco de infecção, especialmente em zonas rurais, sendo classificada pela OMS como uma das cinco maiores doenças parasitárias do mundo (WHO, 2022; OPAS, 2019). Apesar de primariamente rurais, as leishmanioses estão em constante processo de expansão, afetando também áreas urbanas, muito em função do êxodo rural (VON PHILIPSBORN et al., 2015). A migração de pessoas infectadas para áreas de pouca transmissão ou a mobilidade de pessoas não imunes a regiões endêmicas é um fator crucial na transmissibilidade das leishmanioses (MITRA; MAWSO, 2017; WHO, 2022).

Os fatores geográficos, sociais e econômicos estão fortemente associados às leishmanioses, afetando principalmente populações pobres e com poucos recursos de saúde, o que classifica as leishmanioses como doenças negligenciadas (DNs) (WHO, 2022). O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são a chave para o seu controle no mundo, entretanto, possuem limitações e desvantagens que favorecem a manutenção dos parasitos circulantes. A pesquisa para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e novos tratamentos é também limitada, pois apresenta pouco ou nenhum lucro para a indústria farmacêutica, dificultando ainda mais a erradicação dos parasitos (EFSTATHIOU; SMIRUS, 2021).

Os fármacos atualmente disponíveis são limitados em número, além de tóxicos, com eficácia variável, caros, induzem resistência parasitária e possuem dificuldade na administração. Os fármacos à base de antimônio foram os primeiros fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses e seguem até hoje como tratamento de primeira linha. A anfotericina B, paramomicina e miltefosina são fármacos de segunda escolha, mas possuem os mesmos problemas dos antimoniais (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018). A síntese de novos derivados a partir de moléculas conhecidamente ativas contra os parasitos de *Leishmania*

spp., constituem uma das principais alternativas na descoberta de novos fármacos. As naftoquinonas e seus derivados possuem um alto potencial farmacológico, com atividade antiparasitária, antitumoral e antibacteriana conhecida, indicando uma opção assertiva para estudos da atividade leishmanicida (MERRITT et al., 2014).

Assim como o tratamento, o diagnóstico da leishmaniose é restringido a poucas alternativas. Baseia-se em métodos de visualização direta dos parasitos por meio da biópsia ou punção aspirativa dos órgãos acometidos, todavia, é uma técnica de elevado custo e bastante invasiva, além de requererem pessoal especializado e aparato hospitalar (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). O diagnóstico sorológico a partir da imunoaglutinação direta, ELISA e imunofluorescência possui baixa sensibilidade e especificidade, portanto, dificilmente pode ser adotado como uma boa ferramenta diagnóstica (MONTEIRO; MACHADO; ROCHA-SILVA, 2018).

Embora haja diversas técnicas para o diagnóstico, ainda não se tem uma que facilite o seu uso na rotina, havendo a necessidade de desenvolver um método mais rápido, eficaz, seguro, de fácil execução e de baixo custo. O diagnóstico utilizando técnicas microfluídicas é uma ferramenta inovadora e capaz de minimizar os problemas que os métodos diagnósticos para leishmaniose possuem. A principal função do dispositivo microfluídico é aumentar a probabilidade do encontro entre antígenos e anticorpos por meio da aglutinação proporcionada por ondas ultrassônicas, o que pode aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico (WIKLUND; RADEL; HAWKES, 2013).

Com isto, o objetivo deste trabalho é realizar testes em um protótipo de um novo método imunodiagnóstico para leishmaniose tegumentar, utilizando pela primeira vez tecnologia acustofluídica. Além disso, avaliar a atividade leishmanicida de novos derivados naftoquinônicos, que possam constituir novas opções terapêuticas mais seguras e eficazes para o tratamento das leishmanioses.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver um protótipo para método diagnóstico utilizando tecnologia acustofluídica para leishmaniose tegumentar e avaliar a atividade leishmanicida de novos derivados naftoquinônicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão patentária acerca de novos métodos de imunodiagnóstico para leishmaniose tegumentar na última década;
- Produzir antígenos de promastigotas fragmentadas de *L. amazonensis*;
- Realizar testes de desempenho utilizando os antígenos produzidos em dispositivo acustofluídico;
- Avaliar a eficiência do imunoenensaio de imunoaglutinação direta em dispositivo acustofluídico para se diagnosticar as leishmanioses, utilizando amostras de saliva, urina, sangue total, soro e plasma.
- Determinar a citotoxicidade dos compostos sintéticos;
- Investigar a atividade dos derivados sintéticos sobre formas promastigotas extracelulares de *L. amazonensis* e *L. chagasi* em ensaio *in vitro*;
- Identificar a seletividade dos compostos para diferentes espécies do gênero *Leishmania* spp.;

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Doenças negligenciadas (DNs)**

As doenças negligenciadas (DNs) se referem às patologias que afetam populações economicamente desfavoráveis e marginalizadas, suscitando um grave problema de saúde pública mundial. De acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), as DNs são classificadas como causadoras de altos índices de morbimortalidade, afetando especialmente populações residentes em regiões tropicais e subtropicais (OMS, 2021). Essas doenças podem ser prevenidas ou até mesmo controladas por intermédio de ações de serviços de saúde, entretanto, a negligência dos órgãos públicos de saúde, a escassez de investimento pela pesquisa científica e a falta de financiamento do setor público e privado, silenciam a dor de milhares de pessoas expostas em ambientes propícios para o aparecimento dessas doenças (CASULLI, 2021).

As DNs podem ser divididas em diferentes categorias, como: infecções parasitárias, helmínticas, bacterianas, virais, fúngicas, ectoparasitárias ou intoxicação por veneno. Cerca de um bilhão de pessoas no mundo são afetadas pelas doenças negligenciadas parasitárias, especialmente indivíduos vulneráveis, do ponto de vista econômico, social e imunológico (ROGERS et al., 2021). O comportamento e as particularidades dessas doenças prestam um papel importante como indicadores de desenvolvimento das regiões afetadas. A problemática das DNs envolve desde a exposição dos indivíduos a fatores de risco para a transmissão até o tratamento inadequado ou inexistente. A ocorrência de DNs são diretamente influenciadas pelos determinantes sociais da saúde (Figura 1) (DE SOUZA et al., 2020; WELD et al., 2022).



Fonte: Modelo de Dahlgren e Whitehead (1991).

Os fatores socioeconômicos exercem papel fundamental para a manutenção das DNs parasitárias, especialmente as leishmanioses, uma vez que a pobreza aumenta o risco dessa doença, pois está diretamente ligada às condições precárias de habitação e a falta de saneamento básico, gerando lugares propícios para a reprodução dos flebotomíneos, vetores invertebrados dos parasitos de *Leishmania* spp. Além disso, hábitos como deitar no chão ou no ar livre também aumentam o risco de infecção por leishmaniose; a pobreza gera um estado de desnutrição nos indivíduos, aumentando o risco de infecção e a escassez de nutrientes e minerais acabam depletando o sistema de defesa desses indivíduos que acabam progredindo para a infecção, de fato, estabelecida (WHO, 2022).

É urgente a necessidade de pesquisa e desenvolvimento na área de DNs. Gerenciar essas doenças garantiria controle da transmissão, diagnóstico precoce e tratamento adequado, todavia, há falta de infraestrutura e recursos em todas essas etapas. Os programas de assistência à saúde dos indivíduos doentes não dispõem de material adequado para a coleta, armazenamento e transporte, ou ainda não possuem pessoal qualificado (MIGUEL et al., 2021).

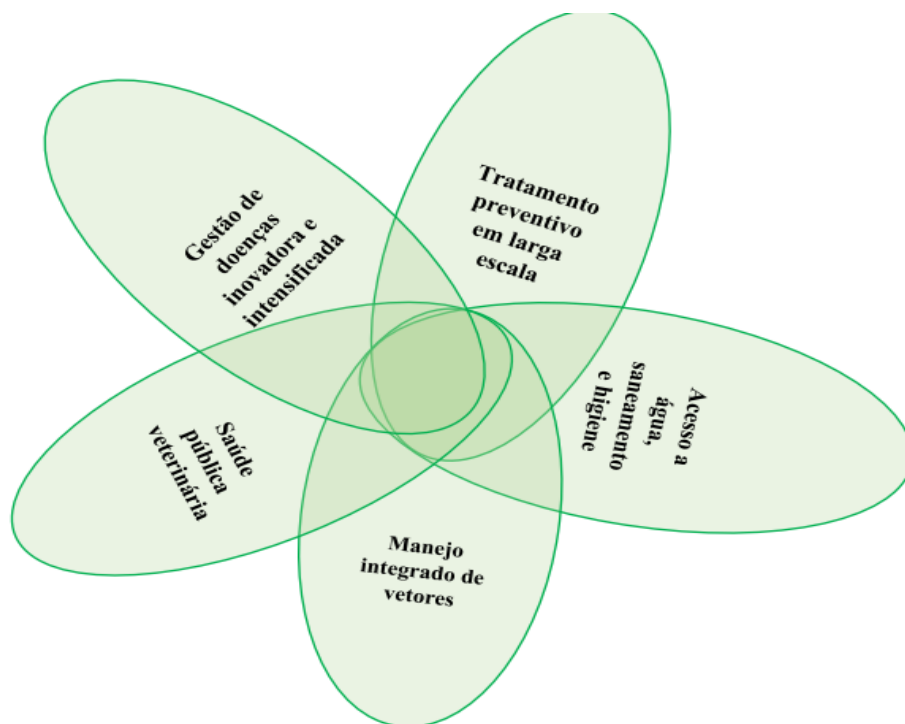
Além disso, há escassez de métodos diagnósticos e opções farmacológicas efetivas e de baixo custo. Os esforços atuais estão aquém do que seria justo e equitativo para solucionar a problemática das DNs. A pandemia da COVID-19 nas áreas endêmicas para as DNs acabou comprometendo ainda mais estes progressos, tanto em função da estagnação dos serviços de saúde no combate às DNs, como do risco de co-infecção entre o coronavírus e patógenos associados (BAĞCI, 2021).

As doenças tropicais negligenciadas parasitárias (DTNs) afetam mais de um bilhão de

peças em todo o mundo, com indivíduos de comunidades pobres sendo os mais vulneráveis e os que mais sofrem (OMS, 2021). Os programas de gerenciamento de doenças são prejudicados pela falta de infraestrutura e recursos para coleta, armazenamento e transporte de amostras clínicas e pela escassez de métodos diagnósticos sensíveis, baratos e precisos. Associado a isto, os fatores ambientais, como o desmatamento, mudanças na temperatura e umidade, implicam diretamente no comportamento dos vetores e no desenvolvimento dos parasitos (VON PHILIPSBORN et al., 2015; CASULLI, 2021; WELD et al., 2022).

A OMS adota uma estratégia comum para combater as DNs por meio de cinco instrumentos fundamentais no setor de saúde pública. Rápidas soluções médicas, como a gestão de doenças e o tratamento preventivo em larga escala, além de ferramentas úteis na prevenção da transmissão, como o acesso à água, saneamento básico e higiene, manejo integrado de vetores e saúde pública veterinária (Figura 2). O conjunto dessas intervenções causam um impacto significativo na prevenção, controle e até erradicação dessas doenças (ENGELS; ZHOU et al., 2020).

**Figura 2 - Intervenções de saúde pública recomendadas para o manejo das DNs**



Fonte: Adaptado de Engels e Zhou, 2020.



### 3.2 Leishmaniose

As leishmanioses fazem parte de um conjunto de doenças parasitárias e infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Mais de 22 espécies de *Leishmania* são conhecidas no mundo, com característica heteroxênica, onde realizam parte do ciclo de vida em vertebrados e outra parte em invertebrados (HAMILTON et al., 2015; OPAS, 2017).

Os parasitos de *Leishmania* são transmitidos aos seus hospedeiros vertebrados através da picada de um pequeno vetor de 2 a 3 mm de comprimento, denominado flebotomíneo. Os flebotomíneos são popularmente conhecidos como mosquito palha, birigui, cangalhinha e pertencem à classe Insecta, da ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Figura 3).

As leishmanioses são antropozoonoses, logo, infectam seres humanos e também animais. Aproximadamente 70 animais já foram identificados como reservatórios naturais para a manutenção dos parasitos, dificultando a erradicação da doença (OPAS, 2019; TOEPP; PETERSEN, 2020; WHO, 2022).

**Figura 3 – Flebotomíneo (hospedeiro invertebrado dos parasitos de *Leishmania* spp.)**



Fonte: ECDE, 2022.

A leishmaniose pode se manifestar a partir de três formas distintas da doença: a forma mais comum, a leishmaniose cutânea (LC), a sua variante conhecida como leishmaniose mucocutânea (LMC) e a forma mais fatal, a leishmaniose visceral (LC). Apesar de não serem totalmente elucidados, a cepa e espécies envolvidas na infecção, a resposta imune do hospedeiro mamífero e as variações genéticas do parasito e hospedeiros, são fatores importantes neste

contexto (KAYE; SCOTT, 2011; WHO, 2022).

O gênero *Leishmania* se divide em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. O subgênero *Leishmania* é comumente encontrado em países e territórios do velho e novo mundo e abrange os complexos *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania mexicana* e outros não patogênicos em humanos. As espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* se desenvolvem aderidas à parede do intestino posterior na região do piloro do flebotomíneo. Já as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* se desenvolvem no intestino anterior e médio do inseto e abrange os complexos *Leishmania braziliensis*, *Leishmania lansoni* e *Leishmania guyanensis*, presentes nos países do velho mundo, conforme mostrado no Quadro 1 (LAISON; SHAW, 1987; AKHOUNDI et al., 2016; OPAS, 2019).

#### Quadro 1 - Taxonomia do gênero *Leishmania* spp.

| Família   | Trypanosomatidae  |  |                 |                      |  |   |  |
|-----------|---|--|-----------------|----------------------|--|---|--|
| Gênero    | <i>Leishmania</i>   |  |                 |                      |  |   |  |
| Subgênero | <i>Leishmania</i>   |  |                 |                      |  | <i>Viannia</i>                                |  |
| Complexo  | <i>L. donovani</i>  | <i>L. tropica</i>                                    | <i>L. major</i> | <i>L. aethiopica</i> | <i>L. mexicana</i>   | <i>L. braziliensis</i>                        | <i>L. guyanensis</i>                         |
| Espécies  | <i>L. chagasi</i><br><i>L. donovani</i><br><i>L. infantum</i> | <i>L. killicki</i> <sup>1</sup><br><i>L. tropica</i> | <i>L. major</i> | <i>L. aethiopica</i> | <i>L. amazonensis</i><br><i>L. ganhami</i><br><i>L. mexicana</i><br><i>L. pifanoi</i><br><i>L. venezuelensis</i> | <i>L. braziliensis</i><br><i>L. peruviana</i> | <i>L. guyanensis</i><br><i>L. panamensis</i> |
| Tropismo  | Viscerotrópico  | Dermotrópico   | Dermotrópico    | Dermotrópico         | Dermotrópico   | Dermotrópico                                  | Mucotrópico                                  |

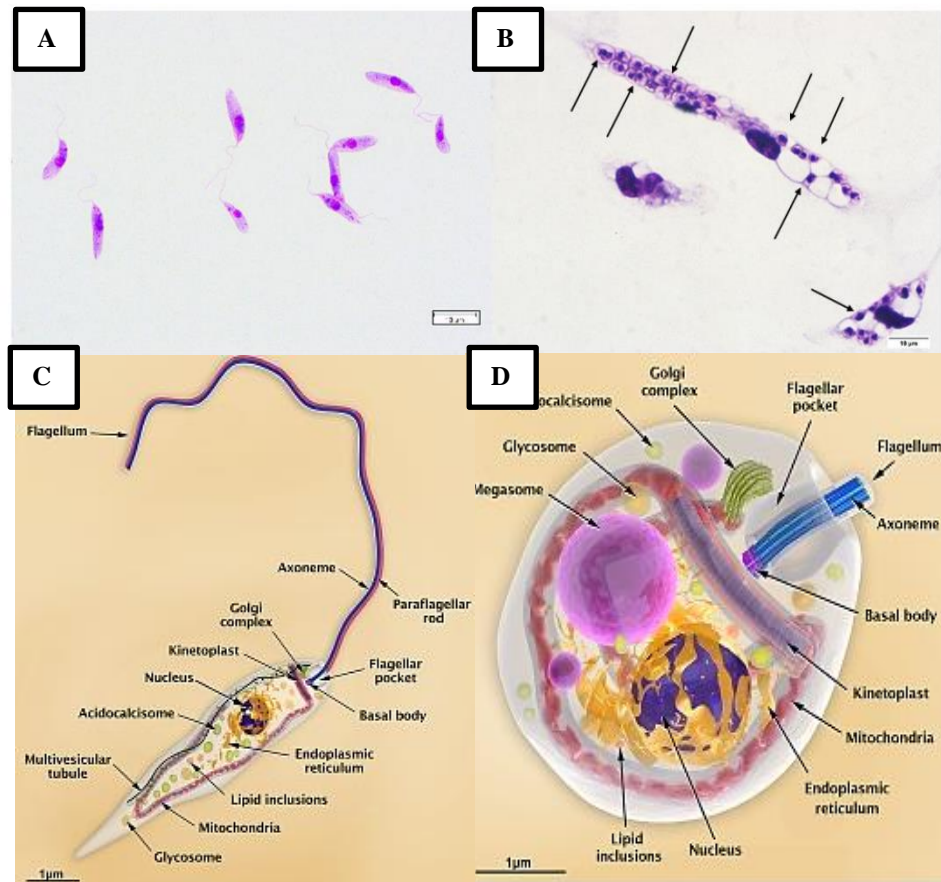
Fonte: Adaptado de OPAS, 2019 e WHO, 2010.

As espécies de *Leishmania* apresentam pleomorfismo, alterando sua forma entre hospedeiro vertebrado e invertebrado. Nos mamíferos a forma encontrada é a amastigota, um parasito intracelular obrigatório, que infecta células fagocitárias, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, abrigando-se em vacúolos parasitóforos. Esta forma possui um comprimento de 3 a 7  $\mu\text{m}$  de comprimento, sem flagelo livre que se mantém na bolsa flagelar, núcleo grande e cinetoplasto pequeno em forma de bastonete (Figura 4 – B e D) (MORAES et al., 2018; FERREIRA et al., 2022).

No trato intestinal do flebotomíneo são encontradas as formas flageladas do parasito, as promastigotas, que medem cerca de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento, com flagelo emergente a partir da bolsa flagelar, possibilitando a motilidade destes parasitos (Figura 4 – A e C) (RAI et al.,

2017; CARFAGNA et al., 2020; WHO, 2022).

**Figura 4 - Formas evolutivas: promastigotas (A e C) e amastigotas (B e D)**



Fonte: Adaptado de Teixeira et al., 2013 e Granato, 2018;

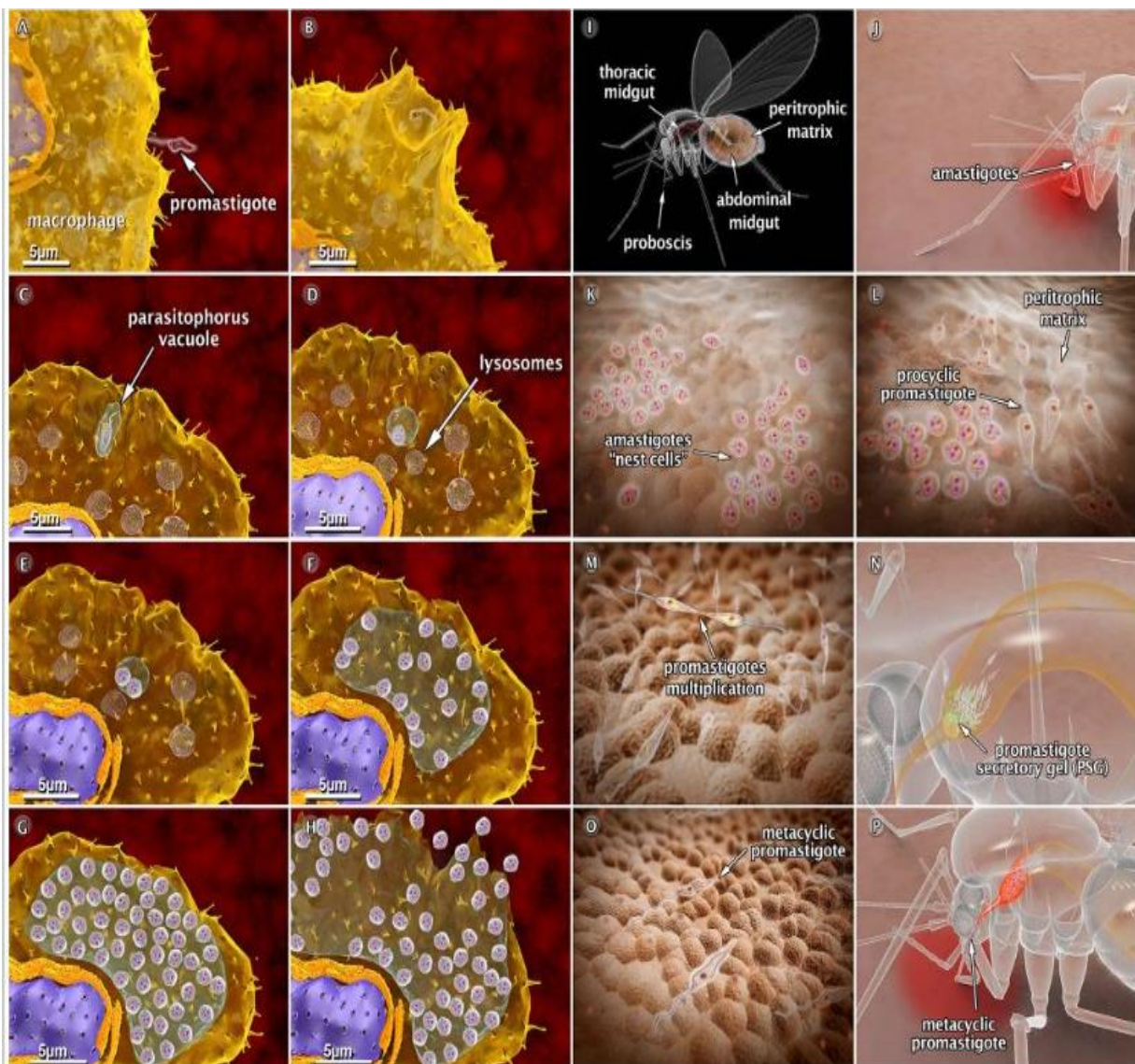
### 3.2.1 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Os protozoários do gênero *Leishmania* spp. são parasitos intracelulares obrigatório, vivem no interior de células mieloides, como monócitos, células dendríticas, neutrófilos e nos macrófagos, deflagrando mecanismos imunológicos na tentativa de defesa contra a invasão desses parasitos. No inseto vetor são encontradas as formas extracelular desses parasitos, as promastigotas. Os flebotomíneos são hematófagos e, durante o repasto sanguíneo, as fêmeas infectadas regurgitam as promastigotas metacíclicas nos hospedeiros que ganham a corrente sanguínea e são fagocitadas por células do sistema monocítico fagocitário, especialmente por macrófagos, abrigo-se no interior dessas células em vacúolos parasitóforos. Por fatores físico-químicos do ambiente intracelular, as formas promastigotas se convertem em

amastigotas, que crescem e se multiplicam até que a membrana celular se rompa, liberando as formas amastigotas na corrente sanguínea para infectar novas células ou serem ingeridas por outro inseto vetores, reiniciando o ciclo de vida da *Leishmania* spp. (JARA et al., 2017).

No intestino médio abdominal do inseto vetor, as amastigotas formam um “ninho de células” e se diferenciam em promastigotas procíclicas. Ao se ligarem no epitélio abdominal do vetor, as promastigotas se transformam em formas metacíclicas infecciosas, reiniciando o ciclo biológico do parasito, conforme mostra a Figura 5 (TEIXEIRA et al., 2013; PIMENTA et al., 2018).

**Figura 5 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp.**



(A) Fixação de um promastigota à superfície do macrófago. (B) Fagocitose da promastigota. (C) Formação do vacúolo parasitóforo e conversão da promastigota em amastigota. (D) Recrutamento e a fusão dos lisossomos do



macrófago e o vacúolo. (E) Divisão binária dos parasitos. (F–G) A multiplicação intensa gera várias centenas de amastigotas. (H) A célula hospedeira estoura e os parasitos ganham a corrente sanguínea. (I) Vista esquemática de flebotomíneo fêmea mostrando o trato digestivo. (J) Durante a hematofagia, o flebotomíneo ingere macrófagos infectados com formas amastigotas. (K) Amastigotas formam “ninhos de células” no intestino médio abdominal. (L) Conversão de amastigotas em promastigotas procíclicas. (M) Promastigotas se multiplicam e se ligam ao epitélio do intestino médio. (N) Os parasitos migram para o intestino médio anterior, retomam a replicação e começam a produzir gel secretor promastigota (PSG). (O) As promastigotas transformam-se em promastigotas metacíclicas infecciosas. (P) As promastigotas metacíclicas infectam um novo hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo.

Fonte: TEIXEIRA et al., 2013.

Estudos sugerem dois modos de transmissão através de flebotomíneos, que irão determinar a gravidade dos sintomas. Flebotomíneos que se alimentam de mamíferos infectados com baixa carga parasitária, acabam transmitindo doenças leves ou assintomáticas. Quando os flebotomíneos se infectam a partir de doentes com alta carga parasitária, acabam desenvolvendo uma alta frequência de promastigotas metacíclicas. A continuação desse ciclo de vida, acaba gerando hospedeiros vertebrados com doenças e sintomas mais graves (COURTENAY et al., 2017).

### 3.2.2 Imunopatogênese da leishmaniose

Os primeiros instantes da infecção são cruciais para determinar a sobrevivência dos parasitos, estando intimamente relacionada ao controle imunológico desempenhado pelos hospedeiros, via mecanismos inatos e adquiridos. Como garantia de sobrevivência, os parasitos se beneficiam da própria saliva do inseto vetor, que possui propriedade anticoagulante, antiagregante plaquetária, vasodilatadora, imunomoduladora, suprimindo parte da resposta imune do hospedeiro (ROGERS et al., 2010; ROSSI; FASEL, 2017). A substância gelatinosa (PSG) também regurgitada pelo flebotomíneo exacerba a infecção e promove o recrutamento de células fagocitárias e o estímulo da atividade da arginase, promovendo o catabolismo da L-arginina e a síntese de poliaminas, cruciais para a replicação dos parasitos (TOEPP; PETERSEN, 2020).

Além disso, os neutrófilos desempenham um papel fundamental no início da infecção, pois fazem parte da primeira resposta imunológica. Estas células chegam primeiro no local da infecção, fagocitam os parasitos e recrutam macrófagos para também destruírem os invasores, por um mecanismo imunológico inato (ALMEIDA et al., 2013; TOEPP; PETERSEN, 2020).

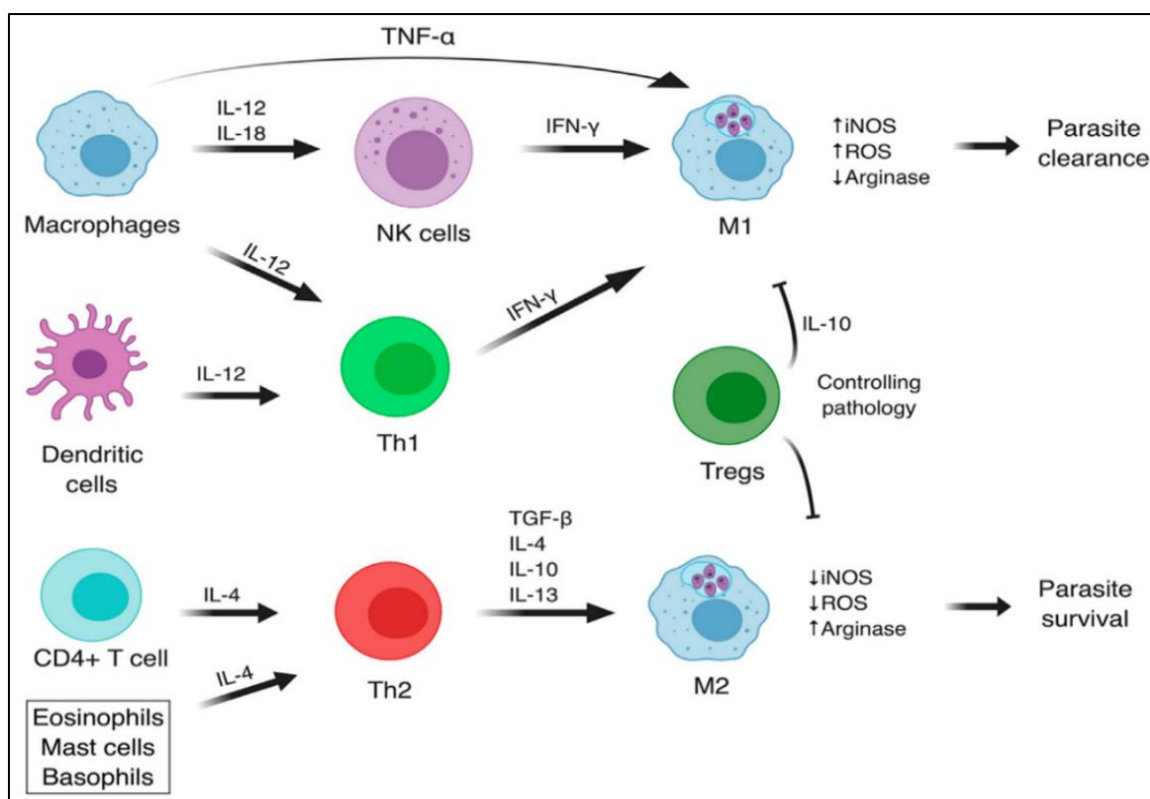
Alguns receptores estabelecem a internalização dos parasitos nos macrófagos, como o receptor do tipo 3 do complemento (CR3), receptor do tipo 1 do complemento (CR1), receptor de manose (MR), receptor de fibronectina (FnR), receptor para porção Fc de IgG (FcR) e outros (BLACKWELL et al., 1985; WILSON; PEARSON 1988; UENO; WILSON, 2012). Dentro dos macrófagos, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e abrigam-se em vacúolos parasitóforos. Os macrófagos são ativados e liberam espécies reativas de oxigênio (EROs) na tentativa de suprimir a replicação parasitária e o avançar da doença (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

O controle imune é determinado pelo tipo de resposta que o hospedeiro irá desenvolver frente a infecção por parasitos de *Leishmania* spp., que requer um equilíbrio entre respostas inflamatórias e reguladoras, conforme esquema mostrado na Figura 6. Este equilíbrio é mediado especificamente por células T CD4+. O perfil de resistência ou sensibilidade à infecção é determinado pela polarização de linfócitos T CD4+ em células Th1, Th2, Th17 ou Treg (SCOTT; NOVAIS, 2016; JAWED; DUTTA; MAJUMDAR, 2019).

A resposta mediada por células Th1 envolve um padrão de citocinas específicas pró inflamatórias, como a IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que estão relacionadas a um perfil de resistência à infecção por *Leishmania*. Essa resposta ativa os macrófagos e estimulam a produção de EROs, em especial o óxido nítrico (NO), gerando uma resposta protetora (ROSSI; FASEL, 2017; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; KUMAR et al. , 2020). As células do tipo Th17 também modulam uma resposta imune inflamatória a partir da liberação de interleucina-17 (IL-17), que recruta neutrófilos e macrófagos para o local da infecção (TRAJANO-SILVA et al., 2017).

A resposta mediada por células Th2 determina um perfil de suscetibilidade à *Leishmania*, com a expressão de fatores anti inflamatórios, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$ . Esse perfil imunológico aumenta a expressão de arginases que competem com a cascata das EROs, levando ao sucesso da infecção e agravamento do quadro infeccioso (ROSSI; FASEL, 2017; MUXEL et al., 2018; SANZ et al., 2021).

**Figura 6 - Mecanismos imunológicos na leishmaniose**



Fonte: DOS SANTOS MEIRA; GEDAMU, 2019.

### 3.2.3 Classificação e manifestações clínicas

Grande parte dos indivíduos infectados por parasitos de *Leishmania* spp. não apresentam sintomatologia alguma. O termo leishmaniose está relacionado ao processo de adoecimento, incluindo o aparecimento de sinais e sintomas característicos da doença. As leishmanioses se apresentam de diversas formas, podendo apresentar infecções leves, formas graves e até mesmo desfigurantes. A forma de apresentação dos sintomas depende muito da espécie causadora da infecção e da susceptibilidade dos indivíduos (HASHIGUCHI et al., 2016; WHO, 2022).

A forma mais comum da doença é a leishmaniose cutânea (LC) e suas variações, leishmaniose cutânea localizada (LCL) (Figura 7-A), leishmaniose mucocutânea (LMC) (Figura 7-B) e leishmaniose cutânea difusa ou disseminada (LCD) (Figura 7-C) (DO NASCIMENTO; 2019; ARAMAYO et al., 2021). Os indivíduos acometidos por esta doença apresentam lesões no tecido cutâneo ou nas mucosas, podendo apresentar lesão única ou

múltiplas, às vezes até 200 lesões, que aparecem no local da picada do inseto vetor. Estas lesões são bem arredondadas, com aspecto ulceroso, indolor, com bordas elevadas e delimitadas e fundo granuloso. Nas lesões pode ser observado um infiltrado inflamatório, contendo células linfocitárias e macrófagos, além da presença dos parasitos. O acometimento da mucosa, a super disseminação das lesões e as cicatrizes permanentes acabam gerando estigmatização e exclusão social dos indivíduos acometidos (REBOUÇAS et al., 2021; WHO, 2022).

**Figura 7 - Leishmaniose cutânea: localizada (A), mucocutânea (B) e difusa (C)**



Fonte: BRASIL, 2017.

A leishmaniose visceral (LV) (Figura 8) é o espectro mais grave da doença e se caracteriza pela disseminação dos parasitos em órgãos como fígado, baço e medula óssea, causando um grave quadro de anorexia, febre duradoura, astenia, hepatoesplenomegalia e discrasias sanguíneas, como a anemia e neutropenia, tornando os indivíduos ainda mais suscetíveis a outras infecções, especialmente as de origem bacteriana (WHO, 2022).

Se não tratada, a LV pode causar 100% de óbitos em até 2 anos. Também há uma variação da LV, denominada leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC). É uma complicação tardia da LV, caracterizada por erupção cutânea hipopigmentada em pacientes que se recuperaram da LV. Sistemicamente, os pacientes com LDPC não são afetados, podendo permanecer por muito tempo sem tratamento, entretanto, constituem importantes reservatórios, mantendo a transmissão dos parasitos nos ciclos epidêmicos (COSTA-MADEIRA et al., 2022; WHO, 2022).



**Figura 8 - Leishmaniose visceral**

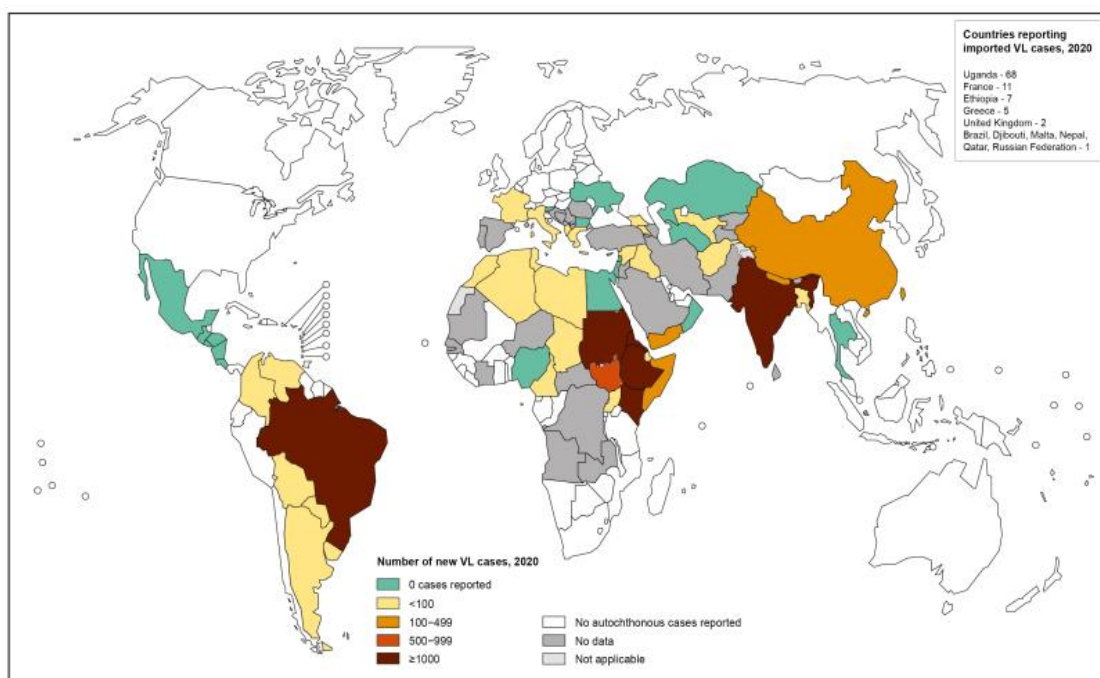


Fonte: BRASIL, 2017.

### 3.2.4 Situação epidemiológica

Segundo a OMS (2022), mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose, com alto risco de infecção. Grande parte do globo, cerca de 102 países e territórios são afetados ou endêmicos e segundo a análise global, anualmente ocorrem cerca de 20 a 30 mil mortes por leishmaniose, fora os números de incapacitação que a doença pode causar. Em 2020, mais de 5 mil casos de LV foram reportados no Brasil, Sudão, Etiópia, Eritreia, Quênia e Índia, conforme mostra a Figura 9.

**Figura 9 – Situação de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo, 2020**

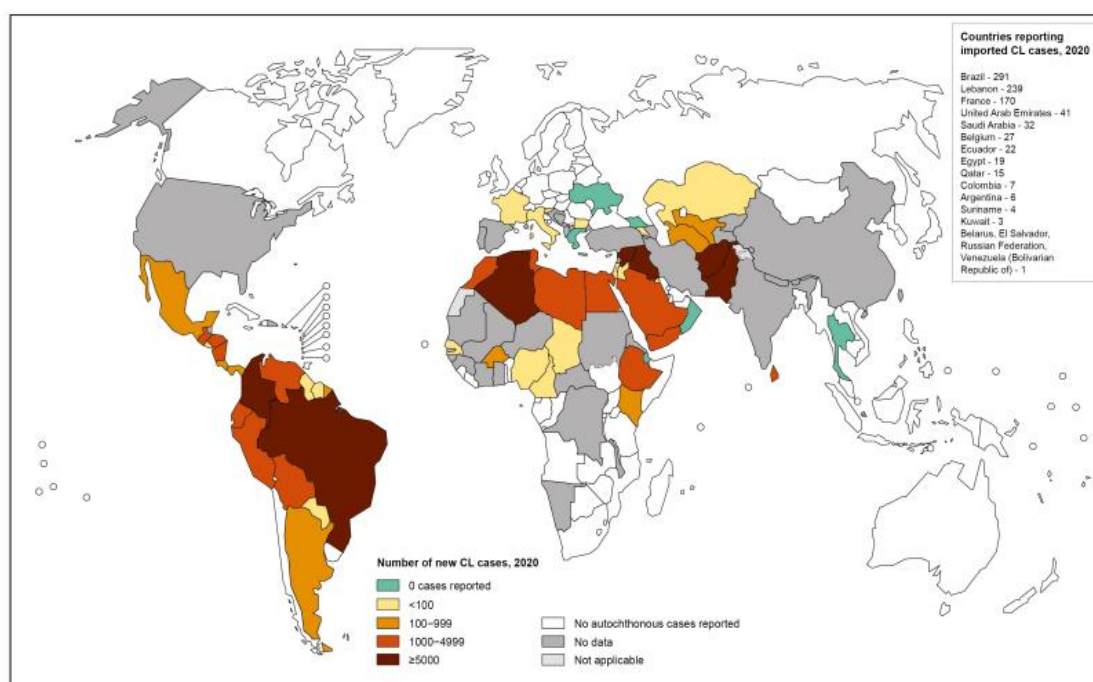


Fonte:WHO, 2022.

Cerca de 30 mil novos casos de LV são reportados anualmente no mundo. Os casos de LV no Brasil representam 96% do total de casos de LV nas Américas. Além da LV humana, a LV canina também é endêmica no Brasil, com uma taxa de infecção canina nas regiões endêmicas de até 20%. Sem o diagnóstico precoce e tratamento adequado, a LV pode ser fatal em até 95% dos casos (OPAS, 2022).

Apesar da baixa letalidade em relação a LV, a LC é o espectro clínico mais comum da leishmaniose. Estima-se que 95% dos casos de LC estejam concentrados nas Américas, no Oriente Médio, Ásia Central e na bacia do Mediterrâneo. Em 2020, o Brasil, Colômbia, Argélia, Afeganistão, Paquistão, Iraque e Síria foram os países que mais notificaram casos de LC no mundo (Figura 10). Só no Brasil mais de 15 mil novos casos foram confirmados. Estes casos estão geograficamente distribuídos nas regiões brasileiras, em especial nas regiões norte e nordeste do país. Destes casos, 5,3% foram notificados como sendo a forma mucocutânea da doença. Em ambos os espectros clínicos, os mais afetados são adultos jovens do sexo masculino (OPAS, 2019; WHO, 2022).

**Figura 10 - Situação de endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2020**



Fonte: WHO, 2022.

### 3.3 Diagnóstico da leishmaniose

O diagnóstico precoce e preciso é de extrema importância para a completa recuperação do paciente. Para o diagnóstico de LC e suas variações, a pesquisa sorológica é bastante limitada, pois não são testes considerados padrão ouro devido à baixa precisão (GOMES et al., 2014). Sendo assim, a LC conta apenas com o diagnóstico parasitológico, por meio da microscopia direta, histopatologia ou cultivo do parasito; o diagnóstico molecular, que permite a caracterização taxonômica da *Leishmania* (PCR convencional e não convencional); e o presuntivo, feito a partir de dados clínicos do paciente, epidemiológicos e exames laboratoriais. Além disso, o diagnóstico diferencial é crucial, pois as manifestações clínicas da LC podem ser semelhantes a outras doenças cutâneas, como hanseníase, queiloide, câncer de pele, tuberculose e micoses de pele (GOMES et al., 2014; PRADA et al., 2021; WHO, 2022).

Na presença de uma suspeita diagnóstica de LC, a história epidemiológica do paciente é de grande importância, pois permite avaliar o potencial risco de infecção por *Leishmania*. Para a demonstração direta dos parasitos em paciente com LC, amostras das lesões são retiradas com o auxílio de uma lâmina por escarificação (Figura 11), aposição ou esfregaço da linfa e coradas para a visualização no microscópio. Em pacientes com LCL, a sensibilidade de exames parasitológicos direto pode variar entre 60 a 95% em culturas e esfregaço, já em pacientes com LCD, a sensibilidade pode chegar a 100% (MAGALHÃES; MOURA, 2015; BRASIL, 2017; OPAS, 2019).

**Figura 11 - Esfregaço por escarificação para demonstração direta do parasito**



Fonte: OPAS, 2019.

Os exames parasitológicos de demonstração direta do parasito ou isolamento em cultura são considerados padrão ouro no diagnóstico de LV. A visualização do parasito geralmente é feita através de material de biópsia ou punção aspirativa da medula óssea posto em lâmina para visualização de amastigotas no microscópio, após coloração. No entanto, para evitar técnicas invasivas, testes sorológicos e imunológicos apresentam-se como alternativas, uma vez que na LV há grande produção de anticorpos. Os principais testes utilizados, são: ELISA, aglutinação direta, reação de imunofluorescência indireta (RIFI), reação de fixação do complemento (RFC) e teste rápido imunocromatográfico (BRASIL, 2014; OPAS, 2019).

Embora seja considerado menos invasivo para obter amostras do que métodos parasitológicos, esses ensaios apresentam sensibilidade e/ou especificidade variável, dependendo do antígeno usado, o estado clínico dos pacientes, a coexistência de reações cruzadas com outras doenças, entre outras variáveis (COSTA et al., 2016; LIMA; COSTA; DUARTE, 2017).

Os testes imunocromatográficos rápidos são amplamente utilizados no Brasil, porém têm as mesmas limitações que outros testes sorológicos, devendo ser interpretados de acordo com um contexto clínico, além de apresentar alta variação com relação à sensibilidade, apresentando performance moderada na América Lática e fraca no continente Africano (MUKHTAR et al., 2015; SOUZA-FILHO; BARBOSA; FIGUEIREDO et al. 2016). Além disso, o diagnóstico da leishmaniose canina também apresenta as mesmas limitações do diagnóstico humano, sendo o cão um importante reservatório da leishmaniose visceral (MAURELLI; BOSCO; MANZILLO et al., 2020).

### 3.3.1 Pesquisa e desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico

Apesar do contexto epidemiológico que as leishmanioses estão inseridas, a falta de diagnóstico de fácil execução, baixo custo, menos invasivos, e alta especificidade e sensibilidade, constituem fatores importantes no aumento da mortalidade e incapacidade nos indivíduos acometidos pela doença. Assim como o tratamento, o diagnóstico é um grande desafio mundial para erradicação da doença, uma vez que o diagnóstico inicial simples, robusto e preciso é decisivo na escolha do tratamento mais adequado (WENG; CHEN; WAND, 2018; REIMÃO et al., 2020).

Embora o diagnóstico da leishmaniose possa contar com metodologias parasitológicas,

imunológicas e moleculares (Figura 12), nenhuma delas provou ser o modelo ideal e preciso para o diagnóstico, devido ao vasto espectro que a doença possui e a variedade de espécies causadoras da infecção, a semelhança com outras doenças e o aumento de casos de co-infecção. Com isto, novas abordagens diagnósticas estão sendo desenvolvidas para melhorar a qualidade do diagnóstico das leishmaniose (REIMÃO et al., 2020; DE BRITO et al., 2020; KUMARI et al., 2021).

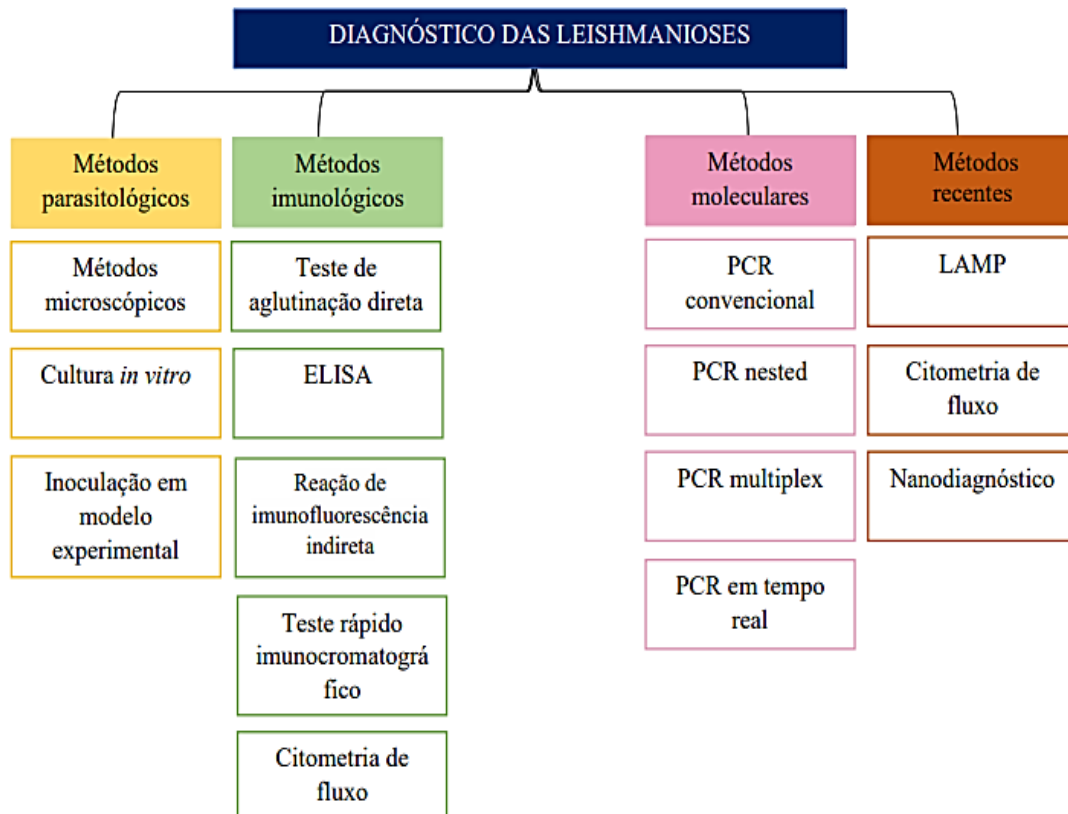
Realizar uma pesquisa estratégica acerca das tecnologias emergentes no campo do diagnóstico da leishmaniose é o primeiro passo para a identificação das potencialidades desse processo de inovação. A prospecção de patentes relacionadas ao desenvolvimento de novos métodos diagnósticos para leishmaniose pode prever e identificar as oportunidades tecnológicas futuras, antecipando e entendendo o percurso dessas novas tecnologias, uma vez que, através disso é possível identificar as demandas sociais e econômicas que envolvem a justificativa dessa nova tecnologia e as necessidades mais relevantes para pesquisas futuras, além de subsidiar e orientar o processo de tomada de decisão para o delineamento de novos diagnósticos que estejam sendo propostos (TEIXEIRA, 2013).

A citometria de fluxo constitui uma recente abordagem diagnóstica/sorológica para as leishmanioses, através da avaliação da expressão de proteínas específicas, viabilidade celular, apoptose e outras análises que podem ser empregadas. A detecção de IgG por citometria de fluxo demonstrou 100% de sensibilidade, mas com baixa especificidade quando comparado ao teste sorológico convencional, o ELISA (PEDRAL-SAMPAIO et al., 2016). Uma outra técnica promissora no campo do diagnóstico para leishmaniose é o uso da nanotecnologia. Martins et al. (2020) imobilizaram antígenos de *L. infantum* em uma superfície com nanopartículas de ouro, o que permitiu o reconhecimento de um epítipo específico no soro de pacientes com leishmaniose.

Os métodos moleculares também passaram por avanços a partir do aprimoramento de técnicas já existentes e de novas técnicas moleculares. Como a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), cujo método é baseado em condições isotérmicas, no qual fragmentos amplificados são visualizados a partir da mudança de coloração, turbidez e fluorescência, demonstrando uma sensibilidade de 92,3% e especificidade de 100%. No entanto, possui limitações na formação de estruturas secundárias de DNA e a necessidade de temperatura adequada (BEZERRA et al., 2020; SRIWORARAT et al., 2015; AKHOUNDI et al., 2017). Outras técnicas moleculares foram descobertas, como a eletroforese enzimática multilocus e a tipagem de sequência multilocus, embora apresentem alta sensibilidade e especificidade, são técnicas caras e inviáveis no contexto de negligência que a leishmaniose está inserida

(CECCARELLI et al., 2018; LAUTHIER et al., 2020).

**Figura 12 - Abordagens diagnósticas para leishmaniose**



Fonte: Adaptado de Kumari et al., 2020.

### 3.3.2 Potencial da tecnologia acustofluídica para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico

A microfluídica é uma área recente que vem ganhando espaço no campo biotecnológico, reunindo princípios da química, biologia, física, dinâmica dos fluidos e outros. A partir da microfluídica, dispositivos miniaturizados podem ser feitos, contendo canais na faixa de microescala, podendo ser empregados na separação e isolamento de bio partículas, desenvolvimento de nanopartículas, entrega e direcionamento de fármacos, diagnóstico e cultura de células (NICULESCU et al., 2021).

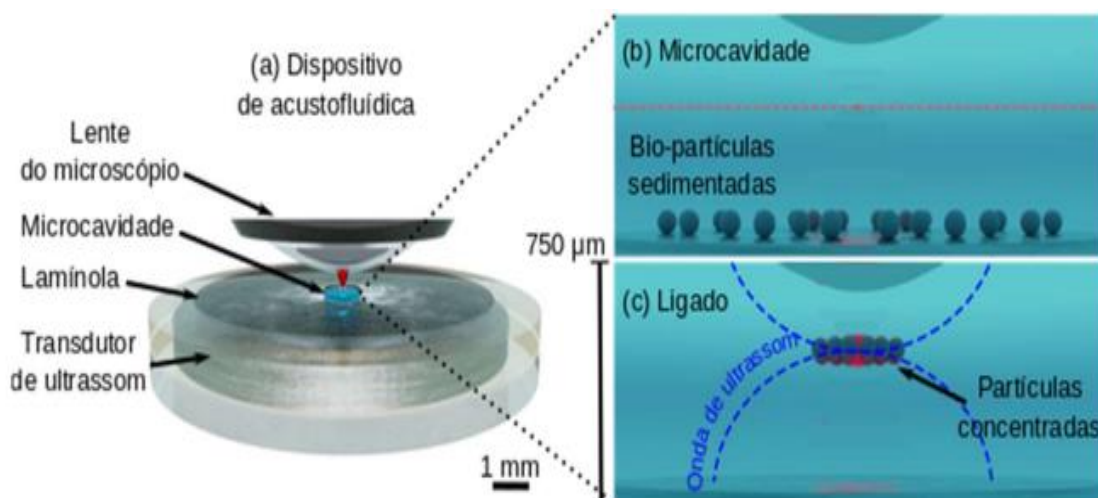
A acustofluídica é a fusão da acústica e da microfluídica. As ondas acústicas são de origem mecânica, logo, têm pouco prejuízo nas células ou biomoléculas, quando utilizadas na

frequência e na potência adequada Normalmente, a manipulação de amostras em dispositivos acustofluídicos tem caráter não destrutivo e possui biocompatibilidade ideal para a manipulação de amostras biológicas (DING et al., 2013; BARANI et al., 2016; CHEN et al., 2016; LI; HUANG, 2018).

Para o diagnóstico de doenças, os dispositivos microfluídicos permitem a utilização de diversas amostras biológicas, como: sangue, urina, saliva, soro, plasma, ou tecidos celulares. Através desses sistemas, objetos minúsculos podem ser endereçados, com o máximo grau de controle possível, desde células humanas, até microrganismos patogênicos, como bactérias e até mesmo vírus (NICULESCU et al., 2013; JADHAV et al., 2021).

Uma das vantagens da utilização de dispositivos microfluídicos para o diagnóstico é a necessidade de volumes pequenos, de maneira muito precisa, automatizada e controlada (SCHELER; POSTEK; GARSTECKI, 2019). Uma outra vantagem, é que a capacidade desses sistemas de atingir células únicas em amostras contendo milhares delas, evita a “perda” da célula durante as investigações biológicas, como ocorre em outros testes, como no ELISA, western blots e PCR (HEYRIES et al., 2011). Na figura 13, é apresentado uma (a) representação esquemática do dispositivo de acustofluídica, (b) bio-partículas dentro da microcavidade e (c) bio-partículas concentradas na região central da microcavidade por efeitos da força de radiação do ultrassom.

**Figura 13 - Funcionamento do dispositivo de acustofluídica. (a) Esquemático do dispositivo de acustofluídica. (b) Bio-partículas dentro da microcavidade. (c) Biopartículas concentradas com o dispositivo ligado.**



Fonte: SANTOS et al., 2021.

Há pouquíssimos estudos sobre leishmaniose descritos na literatura utilizando dispositivos acustofluídicos. Jiménez et al. (2022) estudaram o movimento parasitário de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* durante a exposição a ondas estacionárias ultrassônicas, utilizando para tanto, um dispositivo acustofluídico. Os autores observaram que as duas formas evolutivas de *Leishmania* foram aprisionadas no nó de pressão localizado no centro do canal, apresentando formas e condições de objetividade distintas entre as duas formas evolutivas.

### **3.3 Tratamento farmacológico da leishmaniose**

O tratamento imediato reduz significativamente a prevalência das leishmanioses, prevenindo o risco de incapacidades e morte. Além disso, ajuda a reduzir a transmissão da doença pela diminuição de reservatórios existentes (WHO, 2022). Atualmente existem medicamentos leishmanicida, embora possam ser difíceis de usar, pois a eficácia das drogas acaba variando a depender do sistema imunológico do hospedeiro e também da localização geográfica de onde a infecção foi adquirida, uma vez que muitas regiões possuem cepas de *Leishmania* spp. resistentes aos fármacos atuais. O acesso a medicamentos também constitui um problema de limitação da farmacoterapia da leishmaniose, entretanto, melhorou significativamente graças a um esquema de preços negociado pela OMS e a um programa de doação de medicamentos por meio da OMS (VAN-GRIENSVEN; DIRO, 2019; WHO, 2022).

Há décadas o tratamento das leishmanioses baseia-se no uso de antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina, anfotericina B e pentamidina, entretanto, estas drogas são tóxicas e podem causar efeitos adversos graves. Estes fármacos são comercializados até hoje e possuem estruturas químicas distintas atuando por diferentes mecanismos de ação, conforme mostra o Quadro 2 (BRUNTON; HILALDANDAN; KNOLLMANN, 2018).



**Quadro 2 - Fármacos leishmanicidas, mecanismo de ação, regime terapêutico, eficácia clínica, toxicidade e custo**

| Fármaco e mecanismo de ação   | Regime terapêutico  | Eficácia clínica  | Toxicidade  | Custo   |
|---|---|---|---|---|
| <b>Antimoninais pentavalentes</b> – mecanismo praticamente desconhecido; inibição de várias vias metabólicas prejudicado DNA, RNA e a síntese de proteínas. | 20 mg/kg iv ou im diariamente por 28-30 dias  | 35%–95% (dependendo da área geográfica)   | Frequente, potencialmente grave; toxicidade cardíaca, pancreatite, nefro e hepatotoxicidade                   | Genérico: \$64,5<br>Marca: \$85,6                                 |
| <b>Desoxicolato de Anfotericina B</b> – Inibição da membrana plasmática   | 0,75–1 mg/kg iv por 15–20 doses (diariamente ou dias alternados)                        | > 97% todas as regiões  | Frequentes reações relacionadas à infusão, nefrotoxicidade, hipocalcemia (necessita de internação hospitalar) | Genérico: \$21  |
| <b>Anfotericina B Lipossomal</b> - Inibição da membrana plasmática; Melhor distribuição nos tecidos, meia-vida maior e menor toxicidade                     | 10–30 mg/kg de dose total iv; geralmente 3-5 mg/kg/dose. Dose única (10 mg/kg) na Índia | Europa e Ásia: > 95%; mais baixo na África Oriental e Brasil (dose maior requerida) | Incomum e leve; Nefrotoxicidade.  | Preço preferencial: \$378 (21 mg/kg dose total)<br>Comercial: 10x |
| <b>Miltefosina</b> - Inibe vias de sinalização  | 2–2,5 mg/kg/d por via oral diariamente durante 28 dias                                  | Ásia: > 90%, mas taxa de recaída aumentando.  | Comum, geralmente leve e transitório;   | Preço preferencial: \$ 80,49                                      |

|   |   |  |   |         |
|---|---|--|---|---------|
| intracelular e membrana   | (somente Índia)                                     | África: 93% em pacientes não HIV.  | gastrointestinal (20%–55%), Nefro e Hepatotoxicidade Possivelmente teratogênico |         |
| <b>Sulfato de paramomicina</b> - medicamento aminoglicosídeo, Inibidor da síntese proteica. | 15 mg/kg IM diariamente por 21 dias (somente Índia) | Ásia: 95% (Índia)<br>África: 15 mg/kg: 64% (Sudão <50%)<br>20 mg/kg: 80% (Sudão) | Incomum Nefrotoxicidade Ototoxicidade Hepatotoxicidade Injeções dolorosas       | ~ \$23. |

Fonte: Adaptado de Van-Griensven e Diro, 2019.

O tratamento da leishmaniose foi inicialmente proposto por Gaspar de Oliveira Vianna, em 1912, médico brasileiro que utilizou o antimonial trivalente tártaro emético para tratar LC, constituindo por muitos anos o único fármaco para o tratamento da doença (VIANNA; 1912). No entanto, devido a toxicidade atribuída ao tártaro emético, Brahmachari em 1925, desenvolveu o antimonial pentavalente que até então tem sido utilizado como primeira escolha no tratamento da leishmaniose, devido a melhor eficácia e segurança em relação ao tártaro emético (BRAHMACHARI, 1928).

Os antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®), são os principais fármacos utilizados no mundo para o tratamento das leishmanioses, sendo somente este último comercializado no Brasil e distribuído gratuitamente pela rede pública de saúde, sendo úteis em todas as formas clínicas da doença, embora as formas mucosas possam apresentar uma resposta mais lenta e uma maior probabilidade de recidiva (FERREIRA, 2017; BRASIL; 2017). O antimonial pentavalente é um pró-fármaco, sendo reduzido a sua forma trivalente capaz de inibir a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos, reduzindo a síntese de ATP e GTP, interferindo, portanto, na bioenergética do parasito intracelular (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Os efeitos adversos dos antimoniais podem incluir artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e

insuficiência renal aguda (BRASIL, 2017).

Um outro fármaco de escolha para o tratamento das leishmaniose é a anfotericina B, convencional ou lipossomal, da classe dos antibióticos poliênicos. A forma lipossomal da anfotericina B foi desenvolvida com o intuito de reduzir a toxicidade do fármaco original e aumentar a eficácia do mesmo, porém, o alto custo desse fármaco dificulta a possibilidade de sua aplicação em países pobres na rotina médica. A anfotericina B atua em um componente essencial da membrana do parasito, o ergosterol, gerando um desequilíbrio osmótico, pela abertura de poros na sua membrana. Os efeitos adversos da anfotericina B incluem febre, calafrios, hipocalemia, miocardite e nefrotoxicidade (STONE et al., 2016; BRASIL, 2017; RODRIGO et al., 2018).

A miltefosina é um éster de fosforilcolina de hexadecanol, sendo o único medicamento oral disponível no mercado farmacêutico para o tratamento das leishmanioses. Originalmente, a miltefosina foi idealizada para o tratamento do câncer, mas acabou sendo reposicionada como antiparasitário, com taxas de cura superiores a 94%. O mecanismo leishmanicida da miltefosina está na interferência na biossíntese de fosfolipídios e indução da despolarização mitocondrial dos parasitos. Entretanto, a indução à resistência é um problema que acompanha o uso ampliado da miltefosina, em função do longo tempo de meia vida droga, além do efeito teratogênico associado, o que acaba limitando seu uso (PONTE-SUCRE et al., 2017; SUNDAR et al., 2012; DORLO et al., 2014).

Estudos sugerem que a utilização de monoterapia e o mesmo regime de dose podem influenciar no insucesso do tratamento das leishmanioses, a depender da região geográfica e das características genéticas e imunológicas de cada indivíduo, surgindo assim a grande necessidade de terapias inovadoras, que se enquadrem nos diversos contextos geográficos com alta sensibilidade e especificidade, de fácil administração, preferencialmente por via oral e curta duração (ALVES et al., 2018).

A prospecção de novos alvos terapêuticos consiste numa alternativa interessante para a descoberta de novas terapias para leishmaniose. Algumas vias têm chamado atenção dentro da pesquisa de novos tratamentos para leishmaniose, como alvos terapêuticos promissores: alteração nas vias metabólicas do parasito (glicólise, metabolismo do ácido graxo e esterol, do folato, das poliaminas, dos nucleotídeos e antioxidantes), modulação de peptídeos antimicrobianos expressos durante a infecção, inibição do proteossoma, inibição de proteínas secretoras do parasito e inibição enzimática, especialmente da cisteíno-protease que desempenha um papel crucial na sobrevivência dos parasitos, por interferir na sua virulência, manutenção da viabilidade e da morfologia, invasão do sistema fagocítico mononuclear do

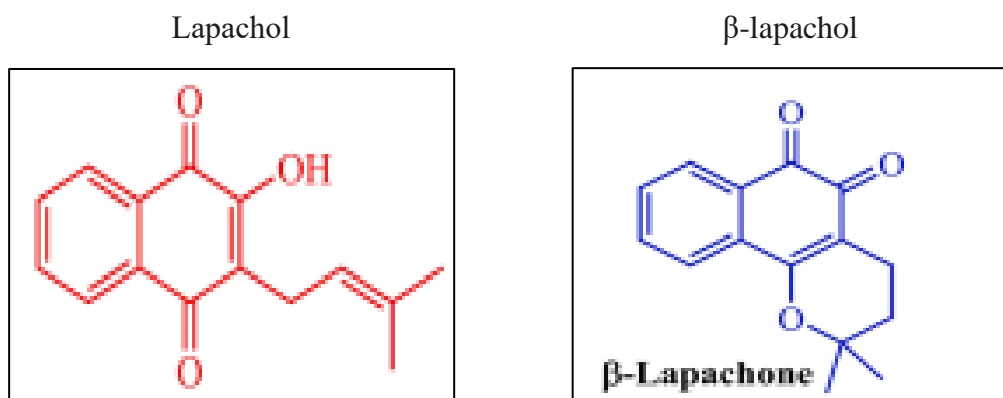
hospedeiro e na modulação da resposta imune (SUNDAR; SINGH, 2018; SILVA et al., 2021).

### 3.3.1 Potencial leishmanicida das naftoquinonas

As quinonas são um grupo de compostos orgânicos aromáticos, geralmente coloridos e semivoláteis. Esse grupo químico é abundante na natureza e possui dois grupos orgânicos nas posições 1,2 (orto), ou 1,4 (para), em um de seus anéis aromáticos. As quinonas podem ser classificadas de acordo com seu sistema aromático como benzoquinonas, fenantraquinonas, antraquinonas e naftoquinonas. As quinonas possuem propriedades químicas interessantes, agindo como agentes oxidantes e desidrogenantes em função do sistema aromáticos de suas moléculas (G DE PAIVA et al., 2015; SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016; FERREIRA et al., 2022).

As moléculas derivadas da classe das quinonas são muito promissoras no desenho de compostos bioativos, especialmente as naftoquinonas. As naftoquinonas são um subgrupo das quinonas, com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiprotozoárias bem relatadas na literatura. Além disso, as naftoquinonas são utilizadas como scaffold para obtenção de novas moléculas com alto potencial farmacológico, principalmente compostos contra doenças parasitárias (ORTIZ-PÉREZ et al., 2021; MENDONÇA et al., 2022).

O lapachol e  $\beta$ -lapachol (Figura 14) são derivados clássicos da naftoquinona extraídos de árvores pertencentes ao gênero *Tabebuia*. Popularmente, os indígenas utilizam essas plantas para tratar infecções de origem parasitária (SILVA et al., 2022). Pertencentes ao grupo 1,4-naftoquinonas, o lapachol e seus derivados apresentam atividade contra tripanossomatídeos, entretanto, apresentam citotoxicidade significativa limitando seu potencial na cadeia de desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários (OLIVEIRA et al., 2018).

**Figura 14 - Naftoquinonas clássicas: lapachol e  $\beta$ -lapachol**

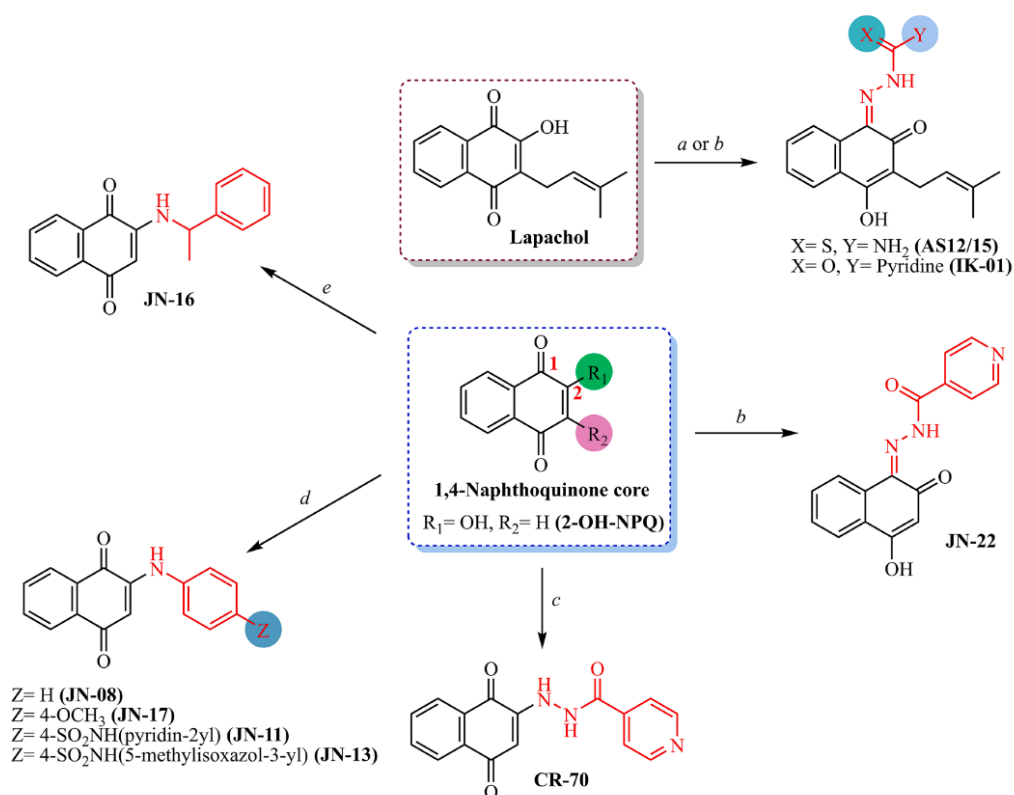
Fonte: SALAS et al., 2008.

Os compostos naftoquinônicos podem interagir com os sistemas biológicos por diferentes mecanismos; através de transferências de elétrons, gerando EROs, como o superóxido e peróxido de hidrogênio, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo ou ainda podem reagir como eletrófilos, gerando ligações covalentes com moléculas biológicas, alterando o funcionamento das mesmas (KUMAGAI et al., 2012).

As principais limitações das naftoquinonas estão relacionadas às características farmacocinéticas, especialmente, a baixa biodisponibilidade; a toxicidade para células mamíferas também constitui um fator limitante, todavia, modificações estruturais nas moléculas podem melhorar a atividade, bem como diminuir o risco de efeitos tóxicos. Além disso, a utilização de sistemas de entregas de drogas, como o uso de sistemas coloidais, lipossomais ou ainda nanopartículas também podem ser úteis nesse contexto (ROCHA et al., 2013; ELLENDORFF et al., 2015; FRANCISCO FERREIRA et al., 2016).

Diante dessa conjuntura, o presente trabalho se propôs a avaliar a atividade leishmanicida de uma série de 1,4-naftoquinonas (Figura 15), que foram planejadas como inibidores de cisteína protease de tripanosomatídeos, sendo comprovado previamente o seu efeito inibitório contra cruzaina e rodesaina, enzimas presentes no *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente (SILVA et al., 2021).

Figura 15 – Planejamento estrutural de derivados 1,4-naftoquinônicos



Fonte: SILVA et al., 2021.

No presente estudo, foram avaliados quanto a atividade leishmanicida três derivados naftoquinônicos: JN-16, JN-17 e JN-22. Como pode ser visto na Figura 15, o derivado JN-22 fora obtido a partir do composto 2-hidroxi-naftoquinona (2-OH-NPQ), através da substituição do oxigênio carbonílico ligado ao carbono C1. Substituintes nitrogenados foram inseridos no carbono C2 no precursor 2-OH-NPQ para obtenção dos demais derivados da série JN, entre estes os derivados JN-16, que possui um grupamento fenil-metilamina em C2 e JN-17, que possui grupamento metoxila inserido no radical Z.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Prospecção tecnológica de novos métodos de imunodiagnóstico para leishmaniose tegumentar**

Foi produzida uma revisão patentária acerca de novos métodos imunodiagnósticos para leishmaniose tegumentar nos últimos 10 anos. Para tanto, dados de depósitos e concessões de patentes foram consultados através das bases tecnológicas, Google Patents, European Patent Office (EPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO), World Intellectual Organization de Propriedade (WIPO), Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), The LENS e Patent Inspiration (PI). A busca foi realizada entre agosto e setembro de 2021. Foram utilizadas nove combinações de descritores em inglês e português. O operador booleano escolhido foi “AND/E”. A pesquisa teve como critérios de inclusão: documentos de patentes que apontaram novos métodos de imunodiagnóstico para leishmaniose tegumentar humana nos últimos 10 anos (2011-2021). Os critérios de exclusão foram documentos que abordassem o desenvolvimento de patentes de leishmaniose visceral, leishmaniose visceral canina, leishmaniose tegumentar canina, métodos de diagnóstico parasitológico, patentes de adição e patentes repetidas.

### **4.2 Desenvolvimento de um novo método de diagnóstico, utilizando tecnologia acustofluídica para diagnóstico da leishmaniose tegumentar**

#### **4.2.1 Planejamento e fabricação do dispositivo acustofluídico**

O dispositivo acustofluídico foi planejado e fabricado pelo Grupo de Acústica Física, coordenado pelo Prof. Dr. Glauber José Ferreira Tomaz Silva.

#### **4.2.2 Manutenção da cepa de *L. amazonensis***

As formas promastigotas da espécie *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) foram obtidas através do Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz/RJ). Estas formas extracelulares do parasito foram mantidas *in vitro* em meio Schneider, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 2% de urina humana à

26°C em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO).

#### 4.2.3 Preparação de antígenos de promastigotas de *L. amazonensis*

A preparação dos antígenos foi realizada seguindo o protocolo para obtenção de promastigotas morfológicamente fragmentadas, a fim de observar o comportamento dos antígenos quanto à concentração e agregação nas microcavidades do dispositivo. Resumidamente, promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de terceira passagem foram reunidas por centrifugação (3.500 rpm) a 4°C durante 10 minutos, lavadas em PBS (Phosphate Buffered Saline) frio e ressuspensas em tampão Tris HCl 5mM frio (pH 7,6). A suspensão foi submetida a agitação mecânica em vórtex durante dois minutos e resfriada em gelo por 10 minutos, este processo foi repetido seis vezes. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 2.300 g. O pellet bruto formado foi ressuspense em 5 mL do tampão Tris e sonicado durante 30 minutos em ultrassom em PBS, obtendo-se antígenos de membrana de promastigotas, conforme a metodologia adaptada descrita previamente (ASAD et al., 2015). Ao término do processamento, os antígenos foram diluídos em concentrações de 1:1, 1:2 e 1:3.

#### 4.2.4 Coloração de antígenos de promastigotas de *L. amazonensis*

Após a obtenção dos antígenos fragmentados, uma solução de 0,1% de azul de coomassie R250 foi adicionado por 90 minutos e agitado em temperatura ambiente. Posteriormente, a suspensão corada foi lavada por centrifugação e ressuspensão (5900 g) várias vezes até o sobrenadante ficar incolor. O sobrenadante foi descartado e uma solução de BSA (Bovine Serum Albumin) a 0,1% foi adicionado. Os antígenos corados foram armazenados no congelador até o momento do uso.

#### 4.2.5 Armadilhamento de antígenos de promastigotas de *L. amazonensis*

Para o armadilhamento dos antígenos de promastigotas de *L. amazonensis* no dispositivo acustofluídico, foram injetados 10 uL da suspensão antigênica com o auxílio de uma pipeta no poço localizado no dispositivo. Posteriormente, a suspensão antigênica



foi submetida a uma frequência de ondas de ultrassom de 3.319 MHz e tensão de pk-pk menos que 5 volts, de maneira que os antígenos foram aprisionados na zona de aprisionamento do dispositivo.

#### 4.2.6 Avaliação da eficiência do ensaio de imunoaglutinação direta em aparelho acustofluídico, utilizando amostras de saliva, urina, sangue total, soro e plasma

Amostras biológicas (saliva, urina, sangue total, soro e plasma) de um indivíduo positivo e negativo para leishmaniose cutânea foram coletadas, processadas e armazenadas até o momento do uso. Para avaliar a eficácia do aparelho, 10 µL de cada amostra coletada foram adicionados a 10 µL da suspensão antigênica, as amostras foram homogeneizadas e inseridas no aparelho acustofluídico para visualização no microscópio conectado ao aparelho acustofluídico. A análise foi realizada por 30 minutos com o aparelho ligado e 10 minutos com o aparelho desligado. As imagens foram capturadas a cada 5 minutos: T<sub>0</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>15</sub>, T<sub>20</sub>, T<sub>25</sub>, T<sub>30</sub>, T<sub>35</sub> e T<sub>40</sub>, para cada amostra analisada.

### **4.3 Estudo da avaliação do potencial leishmanicida de derivados de naftoquinonas**

#### 4.3.1 Obtenção das substâncias

A série de derivados naftoquinônicos foi sintetizada e fornecida pela Profa. Dra. Sílvia Helena Cardoso, do Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal da UFAL/Campus Arapiraca.

#### 4.3.2 Manutenção de linhagem de macrófagos

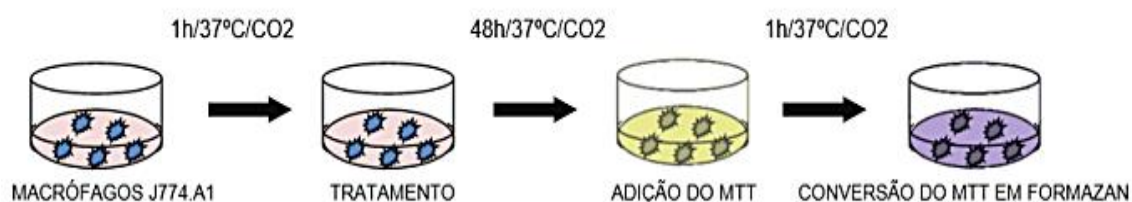
Os macrófagos da linhagem J774.A1 foram conservados em garrafas de cultura em 10 ml de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute-1640) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), L-glutamina, piruvato e aminoácidos não essenciais, mantidas em estufa a 37°C com 95% de umidade e 5% de CO<sup>2</sup>. No momento da utilização, as células foram centrifugadas por 5 minutos, em 1500 rpm a 4°C e contadas em câmara de Neubauer e, posteriormente, ajustadas em meio RPMI suplementado com SFB na concentração de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL, no qual foram lançados 200 µL dessa suspensão em

placa de 96 poços (Nunc, Denmark).

#### 4.3.3 Determinação da viabilidade celular

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram previamente cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de  $3 \times 10^4$  células/poço e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 57% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, para que houvesse a adesão das células no fundo dos poços. Em seguida, os poços foram lavados para a remoção dos macrófagos não aderentes e acrescentados em cada poço 200 µL dos compostos sintéticos previamente diluídos em meio RPMI nas concentrações de 30, 10, 3, 1, 0,3 e 0,1 mg/mL. Nos poços controles, as células foram cultivadas apenas com meio de cultura e no diluente dos compostos, o dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de redução de MTT (Figura 16) (MOSMANN, 1983). A viabilidade das células tratadas com os compostos foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

**Figura 16 - Ensaio de viabilidade celular**



Fonte: Autora, 2023.

#### 4.3.4 Ensaio de viabilidade de promastigotas de *Leishmania* spp.

As formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* foram centrifugadas e resuspensas em meio Schneider suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 2% de urina humana, para obter uma concentração de  $1 \times 10^5$  parasitos/mL. Em seguida, alíquotas de 100 µL dessa suspensão foram distribuídas em placa de 96 poços. Os poços receberam o tratamento com as substâncias sintéticas em diferentes concentrações (30, 10, 1, 3, 0,3 e 0,1 mg/mL) e anfotericina b (100 a 0,001 µM), como também o controle de veículo DMSO (0,2%) preparadas em meio Schneider suplementado, para alcançar um

volume final de 200 $\mu$ L por poço. A placa então foi incubada em estufa BOD a 27 °C por um período de 48 horas. O número de parasitos foi determinado utilizando câmara de Neubauer, em microscópio óptico. A inibição causada por cada substância foi expressa como uma porcentagem em relação às células cultivadas apenas na presença do veículo DMSO.

#### 4.3.5 Análise estatística

A tabulação dos dados foi realizada no software GeaphPad Prisma® (GraphPad Software, San Diego, CA, USA Statistical), onde avaliou-se os níveis de significância entre os grupos experimentais e controles positivos ou negativos, utilizando-se a análise de variância ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett. Os valores foram considerados significativos quando \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5 PRODUTOS

1. NEW IMMUNODIAGNOSTIC FOR HUMAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN THE LAST 10 YEARS: TECHNOLOGICAL PROSPECTING, submetido na revista “*Acta Tropica*”, que possui Qualis (2017-2020) A2 para área de Medicina 1;

2. DEVELOPMENT OF A NEW DIAGNOSTIC METHOD FOR LEISHMANIASIS USING ACUSTOFLUIDICS, a ser submetido na revista “*Analyst*”, que possui Qualis (2017-2020) A1 para área de Medicina 1;

3. EVALUATION OF THE LEISHMANICIDAL POTENTIAL OF NAPHTHOQUINONE DERIVATIVES, a ser submetido na revista “*Experimental Parasitology*”, que possui Qualis (2017-2020) A4 para área de Medicina 1.

## 5.1 Produto 1

### **New immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years: Technological Prospecting**

Lilyana Waleska Nunes Albuquerque<sup>1,2</sup>, Shakira Cavalcante de Albuquerque Ferreira<sup>2</sup>,  
Márcio Thomaz dos Santos Varjão<sup>2</sup>, Amanda Evelyn da Silva<sup>3</sup>, Alysson Wagner  
Fernandes Duarte<sup>4</sup>, Glauber T. Silva<sup>3,5</sup>, Magna Suzana Alexandre-Moreira<sup>2\*</sup>, Aline  
Cavalcanti de Queiroz<sup>2,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas - UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brasil.

<sup>3</sup>IntacLab - Integrated Acoustofluidics Laboratory Ltda, Maceió, AL, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Médicas e de Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas - UFAL / Campus Arapiraca, Arapiraca, AL, Brasil.

<sup>5</sup>Grupo de Acústica Física, Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas - UFAL / Campus A. C. Simões, Maceió, AL, Brasil.

#### **\*Corresponding Author**

Aline Cavalcanti de Queiroz, [aline.queiroz@arapiraca.ufal.br](mailto:aline.queiroz@arapiraca.ufal.br)  
Magna Suzana Alexandre-Moreira, [suzana.magna@gmail.com](mailto:suzana.magna@gmail.com)  
Glauber T. Silva, [gtomaz@fis.ufal.br](mailto:gtomaz@fis.ufal.br)

## Highlights

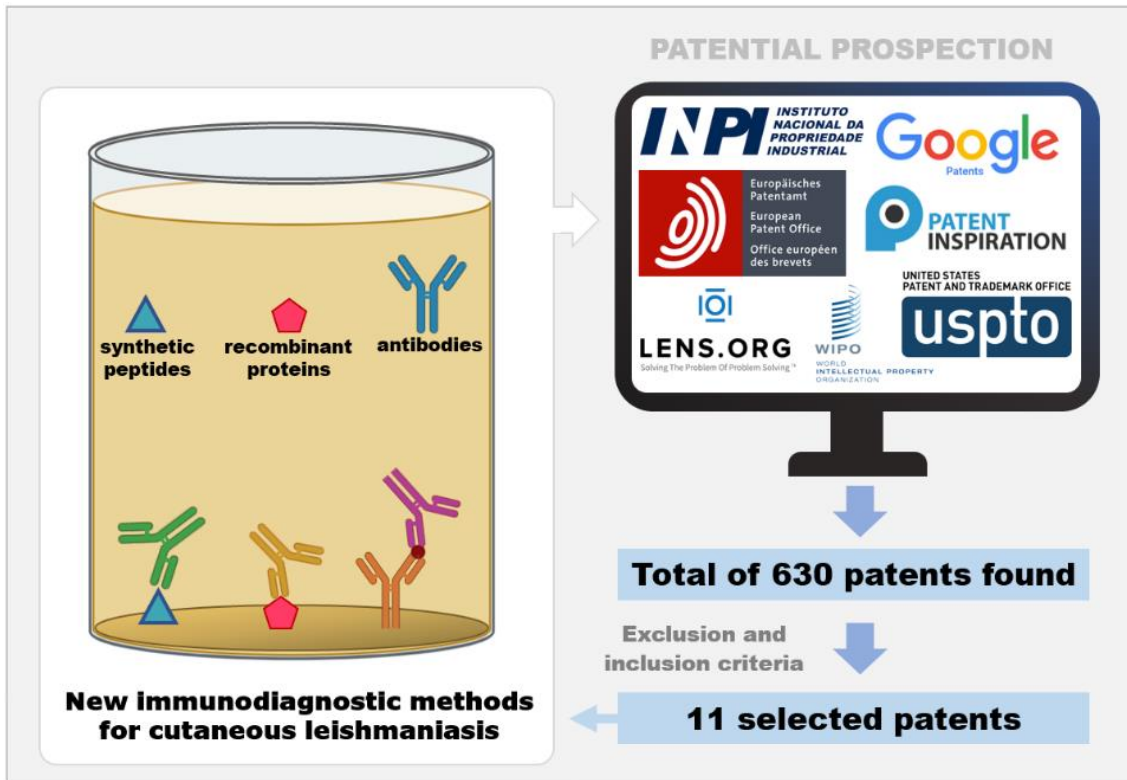
This study is a patent prospection of immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years.

Eleven patents satisfied our search criteria, where six of them were registered in 2017.

Ten patents were registered in Brazil.

The most of the patents included in the study refer to the use of peptides or proteins isolated from the parasites to produce an immunodiagnostic kit.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease and more than 1 billion people live in endemic areas with the risk of infection worldwide. Although it is an important epidemiological issue, the gold standard method of diagnosis requires invasive sample collection and is accompanied by a high level of sensitivity variation in results. The present study aims to conduct a patent prospection of immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years, focused on those with high sensitivity and specificity, and simple usability. We searched seven patent databases: The LENS, WIPO, EPO, USPTO, Patent Inspiration, Google patents, and INPI. Eleven patents were found that satisfy our search criteria, with six of them being registered in 2017. Most patents were registered in Brazil. The information obtained here covers the main characteristics of the immunodiagnostic methods evaluated. Moreover, our prospective study reveals the latest biotechnological advancements achieved in the immunodiagnosis of tegumentary leishmaniasis, especially in Brazil, which holds the majority of patents in this subject. However, no patent for immunodiagnostic methods was found in the last three years, which raises concerns about the present and future trends of leishmaniasis diagnosis.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis. Immunodiagnosis. Patents. Technological prospecting.



## 1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected tropical disease of great importance in global public health, caused by intracellular protozoa of the Trypanosomatidae family and genus *Leishmania*. The literature describes about 20 species of *Leishmania* that are transmitted through the blood meal of infected females of the *Phlebotomus* insect in the Old World, and *Lutzomyia* in the New World (Gabriel et al, 2019). According to data from the World Health Organization, 1.3 million new cases of leishmaniasis have been recorded and several deaths that vary between 20,000 and 30,000 per year (OPAS, 2019).

The variety of species is related to different clinical manifestations. Leishmaniasis is divided into two large groups: visceral leishmaniasis (VL) and tegumentary leishmaniasis (LT) (WHO, 2022). The tegumentary form of the disease is the most common clinical spectrum of leishmaniasis and can present in three different forms: cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (ML) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) (Aronson; Joya, 2019). LC is characterized by the formation of a papule in the region of inoculation of the parasite's promastigotes. This papule is usually found on exposed areas of the body, such as the face, arms and legs. Later, it may progress to a plaque or nodule state (Gabriel et al., 2019; Prada et al., 2021).

The parasite can spread through the bloodstream or the lymphatic system and, consequently, reach the patient's mucous membranes, causing the mucocutaneous form. LM can occur simultaneously with the localized form or approximately one year after the first lesions. The most affected regions are the nasal and oral mucosa (Scorza; Carvalho; Wilson, 2017; Abadías-Granado et al, 2021). The most common species that causes LCD is *L. amazonensis*, a rare and serious condition, especially due to the resistance to treatment associated with this manifestation (Volpedo et al., 2021).

The absence or difficulty in adhering to treatment significantly contributes to the maintenance of parasitic reservoirs, increasing the transmission of infection. Thus, early diagnosis and adequate treatment are essential components for disease control (Anversa et al., 2018; Van-Griensven e Diro, 2018). Direct parasitological diagnosis is considered the gold standard for LT, as it allows visualization of the parasite by means of skin scraping from the lesion, isolation in culture of the parasites in a sterile environment and inoculation in animals (Skraba et al 2014; Santos et al., 2019). Although methods of direct demonstration of the parasite are considered the gold standard, they have variable

sensitivity, between 60 and 95% in cultures and smears (Kassa et al., 2020; Duthie et al., 2018; OPAS, 2019). Molecular diagnosis has also been performed, its main advantage being the ability to taxonomically characterize *Leishmania*, but it uses expensive techniques and requires a specialized laboratory structure (Boni et al., 2017; Barçante et al., 2019).

Several serological assays are available for the diagnosis of TL, indirect immunofluorescence, western blot and the most common one, the ELISA test. Although considered less invasive for obtaining samples than parasitological methods, these assays have variable sensitivity and/or specificity, depending on the antigen used, the clinical status of the patients and the coexistence of cross-reactions with other diseases (Maia et al., 2012 ; Gomes et al., 2014).

Conducting strategic research on emerging technologies in the immunodiagnosis of TL is the first step towards identifying the potential of this innovation process, as it can predict and identify future technological opportunities, anticipating and understanding the course of these new technologies (Teixeira, 2013). The present study aims to conduct a technological prospection of patents related to new immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years, which contribute to the early diagnosis of this parasitosis, that high sensitivity and specificity, using non-invasive methods, of easy and fast execution.

## **2. Search methodology**

The prospection was carried out between August to September 2021 and, for this purpose, data from patent deposits and grants made available in the following technological bases were used: Google Patents, European Patent Office (EPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO), World Intellectual Organization de Propriedade (WIPO), Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), The LENS and Patent Inspiration (PI). In the Brazilian base INPI, combination terms in Portuguese language were used, while in the others the combination terms were used in English.

To this end, the research method cited by Kumar et al (2016) was used through combinations of keywords in order to investigate bibliographic data and abstracts in the first stage of the research and, in a second stage, the full text. This excludes patent losses due to classification errors. For descriptor combinations terms, the Boolean operator

chosen was “and”. Nine combination terms were used, however, due to the large number of patents found and the perception that many of them were outside the scope of the research, combinations terms 5, 6 and 7 were excluded from the second stage of the research. The keywords and combinations terms used are shown in **Table 1**.

**Table 1**

Flow chart illustrating the selection process of the patents in databases.

| Number | keyword 1                          | Boolean operator | Keyword 2          |
|--------|------------------------------------|------------------|--------------------|
| 1      | “Tegumentary leishmaniasis”        | and              | “immunodiagnostic” |
| 2      | “Tegumentary leishmaniasis”        | and              | “diagnostic”       |
| 3      | “Tegumentary leishmaniasis”        | and              | “immunoassay”      |
| 4      | “Leishmaniasis”                    | and              | “immunodiagnostic” |
| 5      | “Leishmaniasis”                    | and              | “diagnostic”       |
| 6      | “ <i>Leishmania</i> ”              | and              | “immunodiagnostic” |
| 7      | “ <i>Leishmania amazonensis</i> ”  | and              | “immunodiagnostic” |
| 8      | “ <i>Leishmania braziliensis</i> ” | and              | “immunodiagnostic” |
| 9      | “ <i>Leishmania guyanensis</i> ”   | and              | “immunodiagnostic” |

Eligibility criteria for the selection of patents were defined. Inclusion criteria were patent documents pointing out new immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years (2011-2021). The exclusion criteria were patent documents related to visceral leishmaniasis, canine visceral leishmaniasis, canine tegumentary leishmaniasis, parasitological diagnostic methods, and addition or repeated patents.

Subsequently, repeated patents were analyzed and discarded in the same database and in different databases. In addition to the distribution of patents per database, the temporal distribution of patents and their distribution of ownership by countries, the main applicants and inventors were evaluated. The International Patent Classification (IPCs) described for each document was also evaluated and the most frequent subclasses and

groups were listed (Fig. 1).

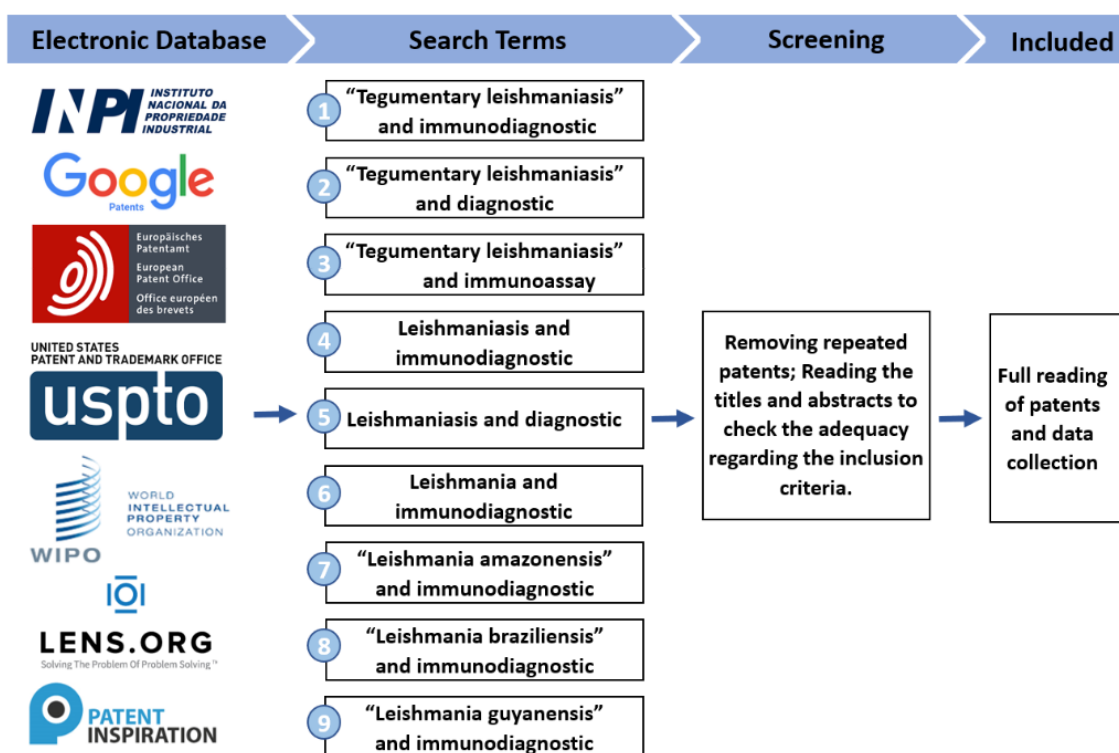


Fig. 1. Flow chart illustrating the selection process of the patents in databases.

### 3. Results

#### 3.1. Patents found in the databases

In the first stage of the research, all the descriptors and combinations listed below were used (Table 2). However, due to the large number of patents found outside the scope of the research, only six combination terms were considered in the second stage of the research. In total, 73,707 patent documents were found, of which 630 went on to the next step that selected the eligible patent documents according to the pre-established criteria. Google Patents was the database that presented the largest number of documents found, followed by WIPO and The LENS, respectively.

**Table 2**

Number of patent documents granted and deposited by databases, according to the combination terms and descriptors, in the period from 2011 to 2021.

| <b>Search terms</b>  |     | <b>INPI</b> | <b>Google patents</b> | <b>WIPO</b>  | <b>The LENS</b> | <b>EPO</b>   | <b>USPTO</b> | <b>PI</b>  | <b>TOTAL</b>  |
|--|-----|-------------|-----------------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|------------|---------------|
| Tegumentary<br>leishmaniasis<br>immunodiagnostic             | AND | 2           | 43                    | 0            | 0               | 6            | 0            | 0          | 51            |
| Tegumentary<br>leishmaniasis<br>diagnostic                   | AND | 1           | 99                    | 21           | 22              | 20           | 5            | 7          | 175           |
| Tegumentary<br>leishmaniasis<br>immunoassay                  | AND | 0           | 41                    | 8            | 6               | 8            | 1            | 2          | 66            |
| Leishmaniasis<br>immunodiagnostic *                          | AND | 8           | 679                   | 10           | 203             | 118          | 54           | 15         | 1.088         |
| Leishmaniasis<br>diagnostic *                                | AND | 13          | 52.768                | 9.440        | 5.250           | 1.697        | 1.432        | 67         | 70.667        |
| <i>Leishmania</i><br>immunodiagnostic *                      | AND | 3           | 738                   | 274          | 183             | 68           | 43           | 7          | 1.322         |
| <i>Leishmania</i><br><i>amazonensis</i><br>immunodiagnostic  | AND | 0           | 85                    | 13           | 3               | 6            | 0            | 1          | 108           |
| <i>Leishmania</i><br><i>braziliensis</i><br>immunodiagnostic | AND | 0           | 159                   | 37           | 15              | 9            | 0            | 1          | 221           |
| <i>Leishmania</i><br><i>guyanensis</i><br>immunodiagnostic   | AND | 0           | 1                     | 0            | 5               | 2            | 0            | 1          | 9             |
| <b>TOTAL</b>   |     | <b>27</b>   | <b>54.613</b>         | <b>9.803</b> | <b>5.687</b>    | <b>1.934</b> | <b>1.535</b> | <b>101</b> | <b>73.707</b> |

\* Combination of descriptors excluded in the second search step.

### 3.2. *Patents selected from the search in the databases*

Após refinamento e exclusão de patentes duplicadas, 630 documentos de patentes foram obtidos das bases de dados, dos quais 11 documentos atenderam aos critérios estabelecidos no estudo. As patentes selecionadas foram identificadas por seu número de acordo com o ano de publicação, conforme tabela 3. In several studies (10/11), the principle of the technique used was the identification/isolation of synthetic peptides or recombinant proteins for the detection of antibodies, through widely used serological methods, such as ELISA, Western-blot or immunochromatography. In the 11 documents, the *Leishmania* species most used in the tests was *L. braziliensis*. The evaluated patent documents did not make it clear or did not mention the sample size used, nor the reference standard test. As for diagnostic performance, four patents registered maximum specificity and sensitivity (100%).

#### **Table 3**

Characteristics of patent documents included in the patent review.

| Patent Number                  | Title   | Ipc  | Principle   | Method                      | Species   | Diagnostic Performance                                     | Country of Origin | Inventors (Publication year) |
|--------------------------------|---|--|---|-----------------------------|---|--|-------------------|------------------------------|
| <a href="#">WO2011153602A2</a> | Recombinant E-ntpdases, use in the production of diagnostic kit for detection of antibodies in leishmaniasis caused by species of the genus <i>Leishmania</i> | C12N 9/16<br>C12N 15/30<br>C12N 15/52                                | Diagnostic kit using of recombinant E-NTPDASES of three species of <i>Leishmania</i> ( <i>L. major</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> ) homologous to its natural protein for detection of anti- <i>Leishmania</i> antibodies.   | ELISA assay<br>Western-blot | <i>L. major</i><br><i>L. braziliensis</i><br><i>L. infantum</i> | 90.3% specificity<br>44.1% sensitivity                     | Brazil            | Fietto et al. (2011)         |
| <a href="#">WO2014091463A1</a> | Process for the production of recombinant proteins of <i>leishmania</i> and use in kit for diagnosis and vaccine against leishmaniasis                        | A61K 39/008<br>A61P 33/02<br>C12N 15/30<br>C12N 15/10<br>G01N 33/549 | Diagnostic kit against leishmaniasis for humans and/or dogs, using recombinant antigens HSP 83-1, MAPK and MAPK3, from proteins present in protozoa of the genus <i>Leishmania</i> , which were selected through bioinformatic analysis.  | ELISA assay                 | <i>L. braziliensis</i><br><i>L. major</i><br><i>L. mexicana</i> | 94.23 to 100.0% specificity<br>96.15 to 100.0% sensitivity | Brazil            | Fujiwara et al. (2014).      |
| <a href="#">WO2015097654A1</a> | Synthetic peptides, method and kit for immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis and human tegumentary and visceral leishmaniasis                      | C07K 7/06<br>G01N 33/569   | Diagnostic method and a diagnostic kit using conserved and polymorphic peptides, were identified among the different species of the genus <i>Leishmania</i> , derived from B cell epitopes for the identification of individuals and animals infected by visceral and tegumentary leishmaniasis | ELISA assay                 | <i>L. braziliensis</i><br><i>L. major</i>                       | 100.0% specificity<br>100.0% sensitivity                   | Brazil            | Bartholomeu et al. (2015)    |

|                                  |  |   |   |   |   |   |        |                                    |
|----------------------------------|--|---|---|---|---|---|--------|------------------------------------|
| <a href="#">EP2827148A4</a>      | Differential diagnostic method and kit for infectious and parasitic diseases, using flow cytometry | G01N 33/569<br>G01N 15/14<br>G01N 21/64<br>G01N 33/58 | Diagnostic method by flow cytometry for the simultaneous diagnosis of Chagas' disease, visceral and cutaneous leishmaniasis using preparations of biological agents stained with a fluorescent substance ( <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. amazonensis</i> or <i>L. braziliensis</i> ) for the simultaneous investigation of the reactivity profile of IgG1 antibodies present in the serum of patients. | Flow cytometry                                      | <i>Trypanosoma cruzi</i><br><i>L. chagasi</i><br><i>L. amazonensis</i> or<br><i>L. braziliensis</i> | Using 77 serum samples, including negative controls and patients with Chagas' disease, visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis, it was possible to identify the high performance of the method, with 98.7% (75/76) correct results, in the first and second batches of parasites | Brazil | Martins-Filho et al. (2015).       |
| <a href="#">BR102016005090A2</a> | Peptide, method and kit for leishmaniosis immunodiagnosis tegumentary and use                      | C07K 14/44<br>C07K 7/06<br>C07K 7/08<br>G01N 33/569   | Serological test from antigens described as very immunogenic found in patients who have the tegumentary form of leishmaniasis. The immunodiagnostic kit consists of one or more peptides and/or one or more metalloproteinases, Clan MA(E), an M3 family protein and the hypothetical conserved protein gi 134063939 that allow the serological diagnosis of cutaneous leishmaniasis.   | ELISA assay<br>Western-blot<br>immunochromatography | <i>L. amazonensis</i><br><i>L. braziliensis</i>   | íííí  | Brazil | Monteiro de Andrade et al. (2017). |



|                                |  |   |   |             |                        |  |        |                       |
|--------------------------------|--|---|---|-------------|------------------------|--|--------|-----------------------|
| <a href="#">WO2017109763A1</a> | Synthetic peptides, method and kit for diagnosing human mucosal leishmaniasis, and use thereof | A61K 39/008<br>C07K 7/06<br>C07K 16/42<br>G01N 33/543 | Kit for mucosal leishmaniasis with six synthetic peptides, isolated or associated, or bacteriophage clones containing these peptides. The peptides used in the kit are as follows: ASFLKNR, SSPFLFS, RSMEIDR, LEKVFSP, KFTLKAR, MKFTLNA (SEQ ID N° 1 to 6).   | ELISA assay | <i>L. braziliensis</i> | 100.0% specificity<br>100.0% sensitivity | Brazil | Coelho et al. (2017). |
| <a href="#">WO2017103909A1</a> | Synthetic peptides, method and kit for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis, and use | A61K 39/008<br>C07K 16/42<br>C07K 7/06<br>G01N 33/543 | Kit for cutaneous leishmaniasis with six synthetic peptides, isolated or associated, or bacteriophage clones containing these peptides. The peptides used in the kit are as follows: KQEDKPI, YLLCISP, HLFLSSF, SVMIPQK, SFINSHG, PGIGSIY (SEQ ID N° 1 to 6). | ELISA assay | <i>L. braziliensis</i> | 100.0% specificity<br>100.0% sensitivity | Brazil | Coelho et al. (2017). |

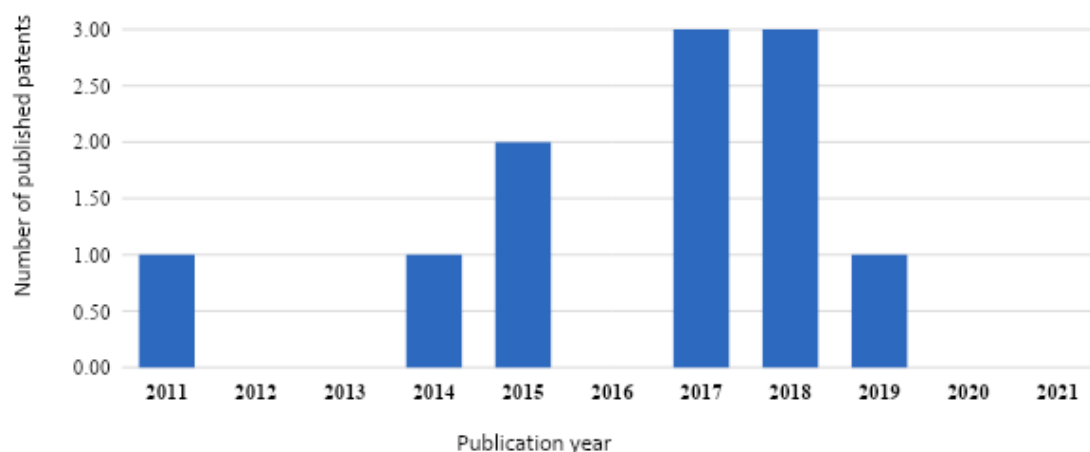
|                                  |  |  |  |             |                        |  |        |                        |
|----------------------------------|--|--|--|-------------|------------------------|--|--------|------------------------|
| <a href="#">BR102015010519A2</a> | Kit for serological diagnosis of leishmaniasis, based on immunoproteomics and use      | C07K 14/44<br>C12N 15/30<br>G01N 33/543<br>G01N 33/569 | Serological kit that contains at least one of the nineteen proteins isolated from the parasite <i>Leishmania braziliensis</i> (SEQ ID N° 1 to 19). The kit is composed of a solid support that can be formed of nitrocellulose, nylon or latex, one or more polypeptides consisting of the sequence of amino acids from 1 to 19, isolated or in association, secondary antibody or protein, conjugated to enzyme or marker and a reagent to detect | ELISA assay | <i>L. braziliensis</i> | iii                                      | Brazil | Coelho et al. (2018).  |
| <a href="#">BR102015032494A2</a> | Synthetic peptides, method and diagnostic kit for human mucosal leishmaniasis, and use | A61K 39/008<br>C07K 7/06<br>G01N 33/543<br>G01N 33/569 | Kit for mucosal leishmaniasis with six synthetic peptides, isolated or associated, or bacteriophage clones containing these peptides. The peptides used in the kit are as follows: ASFLKNR, SSPFLFS, RSMEIDR, LEKVFSP, KFTLKAR, MKFTLNA (SEQ ID N° 1 to 6).  | ELISA assay | <i>L. braziliensis</i> | 100.0% specificity<br>100.0% sensitivity | Brazil | Beatriz et al. (2018). |

|                             |   |  |  |             |   |  |        |                        |
|-----------------------------|---|--|--|-------------|---|--|--------|------------------------|
| <a href="#">EP3017305B1</a> | Peptides and methods for the detection of leishmaniasis   | G01N 33/569                            | Diagnostic kit comprising the two peptides from <i>L. infantum</i> consisting of SEQ. ID. N°9 and of SEQ. ID. N°67, said kit being useful for detecting anti-leishmanial antibodies present in the serum of patient suffering from cutaneous Leishmaniasis or muco-cutaneous Leishmaniasis provoked by infestation of South American Leishmania strain | ELISA assay | <i>L. braziliensis</i><br><i>L. Mexicana</i><br><i>L. major</i><br><i>L. amazonensis</i> or<br><i>L. infantum</i><br><br>American Tegumentary Leishmaniasis | >88% specificity<br>>88% sensitivity                       | Peru   | Arevalo et al. (2018). |
| BR102014013193A2            | Method and Kit for Diagnosing Leishmaniasis Using Synthetic Peptides Derived from the Mitogen-Activated Protein Kinase 3 Encoding Gene (Putative) | C07K 16/20<br>C07K 7/06<br>G01N 33/569 | kit for diagnosing visceral and tegumentary leishmaniasis, using synthetic peptides derived from the gene coding for protein kinase activated by mitogen 3 (putative) of <i>T. cruzi</i> , which is conserved among different species of the genus <i>Leishmania</i> , and polymorphic in relation to hosts humans and canines.                        | ELISA assay | <i>L. braziliensis</i>  | 68.5 to 95.717% specificity<br>70.77 to 98.46% sensitivity | Brazil | Souza et al. (2019).   |

### 3.3. Temporal distribution of patents on new diagnostic methods for human cutaneous leishmaniasis

**Fig. 2** shows the temporal evolution of the number of patent deposits that support new immunodiagnostic methods for human TL, published between the years 2011 to 2021. In 2012, 2013, 2016, 2020 and 2021 no patent documents were published in the search for according to the criteria established in the study. There is a non-linear progression in the number of patents published between 2015 and 2018. In 2017 and 2018 there is a peak of published patent documents, with 3 publications each year (54.5% of the total registered).

However, patent publications fall in 2019 and in 2020 and 2021 patent documents related to the topic were no longer published. From the temporal analysis of the publication of patents, it is inferred that the drop in the registration of new patents in the last two years may be associated with the pandemic of the new coronavirus, since it was necessary to comply with social isolation and the studies turned to the the search for a vaccine and medication against the virus, and research into neglected diseases became even more precarious.



**Fig. 2.** Number of patents filed on new immunodiagnostic methods for human cutaneous leishmaniasis per year.

### *3.4. Geographic distribution of patents on new immunodiagnostic methods for human cutaneous leishmaniasis*

The analysis of documents deposited by country shows a preponderant role of Brazil, with 10 documents, representing 90.9% of the records. Only one patent was published abroad, in Peru, another representant of South America. The search for Intellectual Property is an area that has been growing a lot in recent years, with patents being one of the ways to achieve this objective, in addition to representing indicators of the technological development of a country or region (WIPO, 2019; Thomaz-Soccol et al., 2018). When comparing data on patent applications by country, in 1997 about 88% of patent applications belonged to high-income countries such as the United States. Twenty years later, the distribution of patent filings between high- and middle-income countries is almost equal, such as Brazil and India (WIPO, 2019).

### *3.5. International Patent Classification (IPC) Codes*

The International Patent Classification (IPC) is an important tool for classifying patents and patent applications, used by intellectual property agencies around the world. This classification aims to: assist the search and retrieval of patent documents, orderly organize the documents and serve as a basis for the preparation of statistics on intellectual property (WIPO, 2021). The most frequently found IPC subclasses in the 11 selected patent documents are listed in **Table 4**.

The most cited subclasses G01N and C07K were the most prevalent in the classification of the patents selected in the study, with 40.5% and 29.7% of participation, respectively. The G01N subclass deals with the investigation or analysis of materials to determine physicochemical properties and the C07K subclass comprises the use of peptides. Patents were also associated with the C12N subclass (16.2% of citations), which deals with microorganisms or enzymes and their uses in the area of biotechnology; subclass A61K (10.8% of citations), which deals with preparations for medical purposes; and the A61P subclass (2.7%) with regard to the therapeutic activity of chemical substances or medicinal formulations (WIPO, 2021).

**Table 4**

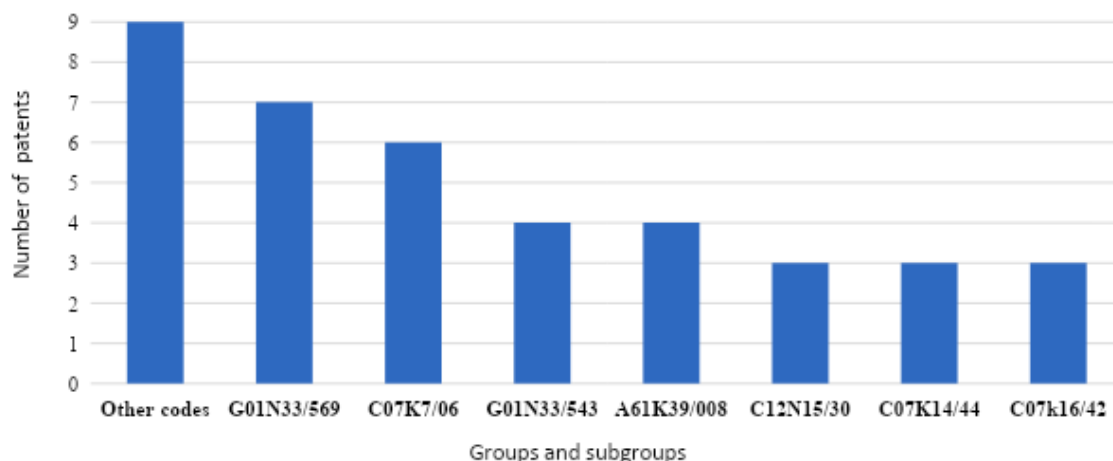
Description of the main subclasses of the International Patent Classification (IPC) associated with the patent documents selected in the study

| IPC Subclasses | Number of citations | Description   |
|----------------|---------------------|---|
| G01N           | 15 (40.5%)          | Investigate or analyze materials, determining their physical properties or determining.   |
| C12N           | 6 (16.2%)           | Microorganisms or enzymes; of the same compositions; propagating, preserving or maintaining microorganisms; genetic change or engineering; culture mediums. |
| C07K           | 11 (29.7%)          | Peptides.   |
| A61K           | 4 (10.8%)           | Medical, engineered or toilet fin preparations.   |
| A61P           | 1 (2.7%)            | Specific therapeutic activity of chemical products or medicinal preparations.   |

According to the most frequent IPC groups, which were associated with the selected patents, G01N 33/569 (07 patents), the most abundant of them, is related to investigation or analysis of materials by specific methods for microorganisms, for example, protozoa, bacteria, viruses, this being a group of great interest in the scope of this research (WIPO, 2021).

Another abundant group, C07K 7/06 (mentioned in 06 patents), deals with peptides containing 5 to 11 amino acids, whose use was for the production of antigens in the proposed tests. Group G01N 33/543 (04 patents) deals with immunoassays with insoluble carrier for immobilization of immunochemicals. Group A61K 39/008 (04 patents) is linked to Leishmania antigens. The C12N 15/30, C07K 14/44 and C07K 16/42 groups were cited in 03 patents and deal, respectively, with genes encoding protozoan proteins, protozoan peptides and peptides against immunoglobulins (anti-idiotypic antibodies). Other codes associated with only 01 patent were C12N 9/16, C07K16/20, C07K 7/08,

C12N 15/10, G01N 33/549, A61P 02/33, G01N 15/14 G01N 21/64 and G01N 33/58 (WIPO, 2021), as shown in **Fig. 3**.



**Fig. 3.** Groups and subgroups of technological areas.

#### 4. Discussion

TL is a serious public health problem worldwide. There are an estimated 600,000 to 1 million new cases occurring annually, but only 200,000 cases are reported to the WHO (WHO, 2022). Early diagnosis considerably increases the chances of therapeutic success, however current diagnostic methods for TL have some disadvantages and limitations, mainly in relation to sensitivity and specificity, due to the variety of clinical forms and species causing the infection and the occurrence of cross-reactions with other pathogens, making it difficult to correctly diagnose the patient (Lage et al., 2019; Pena et al., 2020). In this scenario, there is an urgent need to develop new diagnostic methodologies for TL.

The patent documents selected in the present study demonstrate new methods of immunodiagnosis for TL, developed between 2011 and 2021, however, about 50% were published in 2018 and 2019, with Brazil being the predominant country in the deposit of these patents. According to the World Intellectual Property Indicators (2019), in 2018, there was a strong increase in patent filing activity in Brazil, around 9.8%. Brazil's preponderant role in the technological mapping in this area stems from the interest in seeking new technologies that facilitate the diagnosis of TL, since this clinical form is the

most common in the Americas. In 2016, Brazil, Peru and Colombia accounted for 15% of all TL cases in the world. From 2001 to 2017, more than 940,000 new cases of CL and CML were reported by 17 of the 18 endemic countries in the Americas (WHO, 2022; OPAS, 2019).

The high performance of these new immunodiagnostic methods for TL, demonstrated by their high sensitivity and specificity, mainly in the inventions WO2015097654A1, WO2017109763A1, WO2017103909A1 and BR102015032494A2 whose performance of the diagnostic technique was equal to 100%, seems to be a good alternative to improve the quality of the existing serological tests, as they are based on the production of more selective antigens for detecting antibodies in TL, since patients with this condition produce low levels of anti-Leishmania antibodies, especially those who develop CL (Freire et al., 2021; Vale et al., 2022).

For antibody detection using the evaluated antigenic targets, all patent documents considered the use of the ELISA test to be more viable. The main advantages compared to the ELISA test are mainly related to the method being less invasive in the collection of biological material, the ability to perform the test with several samples at the same time, easy execution and medium cost compared to other immunological methods (Carvalho et al., 2017; Pena et al., 2020).

Although these results are encouraging, the inventions have important limitations from the methodological point of view, constituting barriers that hinder the implementation of these new serological methods in the routine of TL. The main limitations observed were: non-existence or non-citing of the gold standard method as a diagnostic reference, reduced sample size or not cited in the document, non-inclusion of patients with clinical signs that resemble TL (sporotrichosis, paracoccidioidomycosis, leprosy, syphilis and other tegumentary diseases) and not distinguishing the stage of infection and the clinical form of the disease (Freire et al., 2021).

#### **4. Conclusion**

In conclusion, the present prospective study indicated the biotechnological advances in the immunodiagnosis of TL in the last decade, especially in Brazil, the



country that holds the largest number of patents. Although it is observed that the patents identified potential antigenic targets for the detection of anti-Leishmania antibodies, the detection techniques used bring little novelty and are already used in routine, such as ELISA, flow cytometry and western blot. The studies are still preliminary and have decreased in the last three years, despite the epidemiological importance that leishmaniasis has in the field of parasitic diseases.

### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests.

### **Acknowledgments**

*The authors would also like to thank CAPES, CNPq, INCT-INOVAR, MCTI, Decit-SCTIE-MS, SESAU-AL, FAPEAL and the various colleagues working at UFAL for constructive criticism and assistance with this project.*

## References

- ABADIÁS-GRANADO, I. et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, 2021.
- ANDRADE, H. M., RODRIGUES, B. S. S. L., FIALHO JÚNIOR, L. C., PIRES, S. F., OLIVEIRA, E. J. Peptídeos, método e kit para imunodiagnóstico de leishmaniose e uso. BR102016005090A2, 2017.
- ANVERSA, L.; TIBURCIO, M.G.S.; RICHINI-PEREIRA, V.B. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
- AREVALO J., DEHARO, E., PRIVAT-MALDONADO, A. Peptides and methods for the detection the leishmaniasis. EP3017305, 2016.
- ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous leishmaniasis: updates in diagnosis and management. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 101-117, 2019.
- BARÇANTE, T. A. et al. (2019). Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 94, 113-114.
- BARTHOLOMEU, D. C., SOUZA, D. M., MENDES, T. A. O., FUJIWARA, R. T., DELFIN, C. O. C., SILVANO, O. J., MATOS, M. S., Synthetic peptides, method and kit for immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis, and human cutaneous and visceral leishmaniasis. WO2015/097654A1, 2015.
- BONI, S. M. et al. Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 59, 2017.
- BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 92, n. 10151, p. 951-970, 2018.
- CARVALHO, A. M. R. S. et al. An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. **Cellular immunology**, v. 318, p. 42-48, 2017.
- COELHO, E. A. F., TAVARES, C. A. P., COSTA, L. E., GONCALVES, D. U., SOUZA, D. M., SALLES, B. C. S., FILHO, L. R. G., VAZ, E. R. Synthetic peptides, method and kit for diagnosing human mucosal leishmaniasis, and use there. WO2017109763A1, 2017.

COELHO, E. A. F., TAVARES, E. A. P. DUARTE, C. C. PIMENTA, M. C. SOUZA, D. M. Serological diagnosis kit for leishmaniasis, based on immunoproteomics and use. BR102015010519A2, 2018.

COSTA, L.E.; SALLES, B.C.; ALVES, P.T. et al., New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. *J. Immunol. Methods*, v. 434, p 39–45, 2016.

DE BRITO, R. C. F. et al. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p. 1-12, 2020.

DUTHIE, M.S.; LISON, A.; COURTENAY, O. Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 34, p. 881– 890, 2018.

FIETTO J. L. R., LAMÊGO M. R. A., SOUZA R. F., ZÓBOLI A. P. C., BAHIA M. T., AFONSO L. C. C. Recombinant e ntpdases use for producing a dianostic kit for detecting antibodies in various types of leishmaniasis caused by species of the leishmania genus. IN195/CHENP/2013, 2016.

FREIRE, M. L. et al. Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: a systematic review. **Plos one**, v. 16, n. 5, p. e0251956, 2021.

FUJIWARA, R. T. BARTHOLOMEU, D. C, SOUZA, D. M. SILVA, A. L. T. Lilian Lacerda BUENO, L. L. GOMES, M. S. Method for producing leishmania recombinant proteins and use in a diagnostic kit and vaccine against leishmaniasis. WO2014091463A1, 2014.

GABRIEL, ÁUREA et al. Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. **Journal of immunology research**, v. 2019, 2019.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 89, p. 701-709, 2014.

KASSA, MEKIBIB et al. Diagnostic accuracy of direct agglutination test, rK39 ELISA and six rapid diagnostic tests among visceral leishmaniasis patients with and without HIV coinfection in Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 12, p. e0008963, 2020.

KUMAR, R.; TRIPATHI, R. C.; SINGH, Vrijendra. Keyword based search and its limitations in the Patent document to secure the idea from its infringement. **Procedia Computer Science**, v. 78, p. 439-446, 2016.

LAGE, D. P. et al. A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant Leishmania hypothetical protein. *Immunobiology*, v. 224, n. 4, p. 477-484, 2019.

LIMA, M.P.; COSTA, L.E.; DUARTE, M.C. et al., Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. **Parasitol. Res.**, v. 116, p. 1197–1206, 2017.

MAIA, Z. et al. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 1, p. e1484, 2012.

MARTINS-FILHO, O. A. et al., Differential diagnostic method and kit for infectious and parasitic diseases, using flow cytometry. US2017/0168050A1, 2017.

MONTEIRO, A. H, SOARES, S. L. R. B. CARLOS, F. J. L. FONSECA, P. S. EDWARD, J. O. Peptide, method and kit for leishmaniosis immunodiagnosis tegumentary and use. BR102016005090A2, 2017.

MUKHTAR, M.; ABDOUN, A.; AHMED, A.E. et al. Diagnostic accuracy of rK28-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis: a prospective clinical cohort study in Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 109, p. 594–600, 2015.

Organización Panamericana de la Salud (OPAS). Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019.

PENA, H. P. et al. Accuracy of diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis: a systematic literature review with meta-analyses. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 10, p. 1168-1181, 2020.

SALLES, B. C. S., TAVARES, C. A. P., SOUZA, D. M., GONCALVES, D. U., COELHO, E. A. F., VAZ, E. R., COSTA, L. E., FILHO, L. R. G., Synthetic peptides, method and diagnostic kit of human mucosal leishmaniasis, and use. BR102015032494A2, 2015.

SANTOS, T. T. O. et al. Recombinant Leishmania eukaryotic elongation factor-1 beta protein: a potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans. *Microbial Pathogenesis*, v. 137, p. 103783, 2019.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

SILVA, A. L. T., BARTHOLOMEU, D. C., LOBO, F. P., CUNHA, J. L. R., BUENO, L. L., CARDOSO, M. S., JUJIWARA. R. T. Method, kit for diagnosis of leishmaniasis and use. BR102017005135A2, 2018.

SKRABA, C. M. et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of Leishmania (Viannia) braziliensis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 78, n. 4, p. 411-417, 2014.

SOUZA, D. M. BARTHOLOMEU, C. D, FUJIWARA, T. F., MENDES, A. O. T. Method and Kit for Diagnosing Leishmaniasis Using Synthetic Peptides Derived from the Mitogen-Activated Protein Kinase 3 Encoding Gene (Putative). BR102014013193A2, 2019.

SOUZA-FILHO, J.A.; BARBOSA, J.R.; FIGUEIREDO, F.B. et al. Performance of Alere™ immunochromatographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 225, p.114–116, 2016.

TAVARES, C. A. P; COELHO, E. A. F.; SALLES, B. C. S.; COSTA, L. E.; SOUZA, D. M.; GONÇALVES, D. U. Synthetic peptides, method and kit for diagnosing human cutaneous leishmaniasis, and use thereof. WO2017103909A1, 2017.

TEIXEIRA, L. P. Prospecção tecnológica: importância, métodos e experiências da Embrapa Cerrados. 2013.  
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100348/1/doc-317.pdf>

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Recent advances in vaccines against Leishmania based on patent applications. **Recent patents on biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 21-32, 2018.

VAN-GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 33, p. 79– 99, 2019.

VOLPEDO, G. et al. Mechanisms of immunopathogenesis in cutaneous leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, p. 512, 2021.

VON-STEBUT, E. Leishmaniasis. **J. Dtsch. Dermatol. Ges.**, v. 13, n. 3, p.191- 200, 2015.

WHO, World Health Organization (2022). Leishmaniasis. Disponível em [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/) . Acesso: 05 Mar. 2022.

WIPO - World Intellectual Property Organization. Publicação IPC n.d.  
<http://ipc.inpi.gov.br/classifications/ipc/ipcpub/?notion=search&version=20200101&symbol=none&menulang=pt&lang=pt&viewmode=f&fipcpc=no&showdeleted=yes&indexes=no&headings=yes&notes=yes&direction=o2n&initial=A&cwid=none&tree=no&searchmode=smart> (accessed September 23, 2021)

## 5.2 Produto 2

### Development of a new diagnostic method for leishmaniasis using acustofluidics

Giclênio Cavalcante<sup>a¶</sup>, Lilyana Waleska Nunes Albuquerque<sup>b¶</sup>, Ana Maria Torres da Silva<sup>a#</sup>, Harrisson David Assis Santos<sup>a#</sup>, Shakira Cavalcante de Albuquerque Ferreira<sup>b#</sup>, Amanda Evelyn da Silva<sup>b#</sup>, Alysson Wagner Fernandes Duarte<sup>c#</sup>, Magna Suzana Alexandre-Moreira<sup>b&</sup>, Aline Cavalcanti de Queiroz<sup>\*b,c&</sup>, Glauber José Ferreira Tomaz Silva<sup>\*a&</sup>

<sup>b</sup>*Grupo de Acústica Física, Instituto de Física - Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, CEP: 57072-970, Maceió-AL, Brasil*

<sup>a</sup>*Laboratório de Farmacologia e Imunologia- Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, CEP:57072-900, Maceió – AL, Brasil*

<sup>c</sup>*Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Centro de Ciências Médicas e de Enfermagem, Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, CEP: 57309-005, Arapiraca-AL, Brasil*

\*Address for correspondence: Grupo de Acústica Física, Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, Maceió, AL, CEP: 57072-900, Brazil.

Tel: +55 82 32141527.

#### \*Corresponding Author

Glauber T. Silva, [gtomaz@fis.ufal.br](mailto:gtomaz@fis.ufal.br)

Aline Cavalcanti de Queiroz, [aline.queiroz@arapiraca.ufal.br](mailto:aline.queiroz@arapiraca.ufal.br)

¶These authors contributed equally to this work.

#These authors contributed equally to this work.

&These authors also contributed equally to this work.

Declarations of interest: none

## Development of a new diagnostic method for leishmaniasis using acustofluidics

### Abstract

Leishmaniasis is a neglected disease that, despite its epidemiological importance, still has limitations in terms of diagnosis, either because the gold standard uses an invasive method of collecting biological samples, or due to variation in sensitivity, requirement for laboratory structure, highly qualified technicians or high cost of other methods used. For this purpose, an acustofluidic device with 3D printing technology was designed and manufactured to perform ultrasound-enhanced direct agglutination tests. Antigen production was standardized, and antigens were obtained with morphologically fragmented promastigotes which were then stained. Samples containing *Leishmania amazonensis* antigens were successfully trapped within the apparatus by ultrasound force in a volume of less than 10 microliters. Then, the antigens were diluted in biological samples (saliva, urine, plasma, serum and whole blood) from positive and negative individuals for cutaneous leishmaniasis, in order to evaluate the efficiency of the method. The particle agglomeration pattern seems to change according to the type of biological sample and between negative and positive samples, but for a qualitative evaluation the results are inconclusive and require further studies to determine the conditions to avoid the agglomeration of antigens in the samples. negatives. Improvement studies must be carried out and the results obtained here do not rule out the possibility of developing a new diagnostic method to be used in the screening and diagnosis of this neglected disease.

**Keywords:** Leishmaniasis. Direct agglutination test. Devices for acustofluidics.

## Introduction

Leishmaniasis is characterized by being a set of anthroponosis with a variety of clinical manifestations due to infection with parasites of the genus *Leishmania*, being classified into two main clinical forms: the tegumentary form, in which there is the appearance of lesions on the skin and mucous membranes, being caused by dermatropic species of *Leishmania*; and the visceral form, which presents as etiological agents, mainly, the species *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum chagasi*, which generate a systemic infection characterized by fever, anemia, pancytopenia, hepatosplenomegaly, and can be fatal in patients not treated properly (1, 2).

This neglected disease is endemic in 98 countries in temperate and tropical regions with 1 billion people living in areas at risk for developing one of the many forms of the disease. The estimated global annual prevalence of all forms of leishmaniasis is almost 12 million, the annual incidence is 1 million new cases, in addition to having more than 30,000 annual deaths (3). Brazil is responsible for 90% of reported cases in the Americas and is the third largest focus of global visceral leishmaniasis, still constituting a major public health problem for the country (3, 4).

As untreated patients with leishmaniasis constitute reservoirs of the parasites and, therefore, contribute to the transmission of the disease, early diagnosis and treatment are considered an essential component in disease control (1, 5). The parasitological diagnosis is the gold standard for the diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis, using as samples the biopsy of the tegumentary lesion or the bone marrow aspirate, respectively (1, 6). However, this method has variable sensitivity and involves invasive sample collection procedures, especially in patients with the visceral form. Consequently, infected hosts may remain untreated and develop symptomatic disease (7).

For the etiological diagnosis, alternatives include molecular approaches for the detection of *Leishmania* spp. through confidential methods based on the polymerase chain reaction (PCR), which can detect the *Leishmania* genus to confirm leishmaniasis (as with other parasitological methods) or identify the *Leishmania* species (8). Although there has been a substantial increase in the application of molecular biology techniques for the identification of *Leishmania* species, their widespread use in diagnosis is still hampered



by the high cost of execution, as well as the requirement of substantial laboratory infrastructure and domain of technical knowledge, being limited to well-established reference laboratories (9, 10).

Several serological assays are available, including direct agglutination test, ELISA and immunofluorescence (2). Although considered less invasive to obtain samples than parasitological methods, these assays have variable sensitivity and/or specificity, depending on the antigen used, the clinical status of the patients, the coexistence of cross-reactions with other diseases, among others (11, 12). Furthermore, several of these assays are too complicated for use in endemic areas (2). Rapid immunochromatographic tests are widely used in Brazil, but they have the same limitations as other serological tests, and must be interpreted according to a clinical context, in addition to presenting high variation in relation to sensitivity, presenting moderate performance in Latin America and weak in the African continent (13, 14). In addition, the diagnosis of canine leishmaniasis also has the same limitations as the human diagnosis, with the dog being an important reservoir of visceral leishmaniasis (15).

Therefore, there is a pressing need to develop a highly standardized, sensitive, specific, easy and fast diagnostic method to detect leishmaniasis, especially in Brazil's rural region. In this context, this study sought to develop a new rapid and specific diagnostic method for cutaneous leishmaniasis, non-invasive, easy to perform, based on the use of varied patient samples (serum, peripheral blood, urine and saliva), based on the principle of beginning of immunoagglutination, using an acoustofluidics device. The main action of the device is to increase the probability of antigen and antibody collisions through the agglutination and concentration of these bio-particles, using ultrasound standing waves (16). The objective of the present work is to develop a new method of diagnosis for leishmaniasis, from the immunoagglutination technique, using an acoustofluidic device, which is more efficient (with greater selectivity and specificity), low cost and without the need for laboratory facilities.

## Material and methods

### *Planning and fabrication of the acoustofluidic device*

The device used to carry out this work was designed to manipulate the parasite that causes leishmaniasis through Autocad design, Comsol simulations and injection and separation modules of biological samples, as well as to carry out the immunoassay. Therefore, we used parameters such as dimensions and physical properties of this parasite, to simulate an acoustic microcavity with a resonance pattern conducive to the desired entrapment. From computer simulations, we obtained a 3D model, in a computer-aided design (CAD) file, suitable for 3D printing. We use a 3D resin printer, with digital light processing (DLP) technology, to print the CAD file. We couple these devices with microfluidics, an ultrasonic element, allowing the parasites, when injected into the device, to levitate so that they are not influenced by the walls and the substrate. The configuration consists of a cylindrical microcavity, sealed with a glass slide, two microchannels, “inlet” and “outlet”, are used to access the cavity, the ultrasound is obtained by a piezoelectric element with resonance at a frequency of 3.4 MHz.

Observations of agglomerates and evolutions inside the cavity were carried out through cameras coupled to optical microscopes. To carry out the analyses, we first sterilize the device by applying 70% alcohol through the inlet channel, this process also helps to eliminate any residue that is inside the device and prevents the emergence of air bubbles inside the cavity, then we use distilled water to remove any volume of alcohol present, finally we inject it with PBS to leave the cavity environment conducive to the manipulation of microorganisms.

With the device clean, we connected it to a function generator operating at a frequency close to 3.319 MHz and an amplitude of 5 Vpp. This frequency can be adjusted according to the samples used and the need for the tests being carried out, it is also possible to accelerate the agglomeration process by increasing the signal power, limited to a maximum of 10 Vpp, an oscilloscope was used to monitor the signal. Data acquisition took place through the proprietary software Cellsens Entry, which provides connection to the DLP used in the optical microscope, initial evaluations are performed from the visual

evaluation of these results.

#### *Maintenance of the L. amazonensis strain*

The promastigote forms of the *Leishmania amazonensis* species (MHOM/BR/77/LTB0016) were obtained from Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Oswaldo Cruz Institute - Fiocruz/RJ). These extracellular forms of the parasite were maintained in vitro in Schneider medium, supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 2% human urine at 26°C in a Biochemical Oxygen Demand (BOD) incubator.

#### *Preparation of L. amazonensis promastigote antigens*

Antigen preparation was carried out following the protocol for obtaining morphologically fragmented promastigotes, in order to observe the behavior of the antigens in terms of concentration and aggregation in the microcavities of the device. Briefly, third-pass stationary phase *L. amazonensis* promastigotes were pooled by centrifugation (3500 rpm) at 4°C for 10 minutes, washed in cold PBS and resuspended in cold 5 mM Tris HCl buffer (pH 7.6). The suspension was vortexed mechanically for two minutes and cooled on ice for 10 minutes, this process was repeated six times. Then, the suspension was centrifuged for 10 minutes at 2.300 g. The formed crude pellet was resuspended in 5 ml of Tris buffer and sonicated for 30 minutes under ultrasound in PBS, obtaining promastigote membrane antigens, according to the adapted methodology described previously (17). At the end of processing, the antigens were diluted in concentrations of 1:1, 1:2 and 1:3.

#### *Staining of L. amazonensis promastigote antigens*

After obtaining the intact and fragmented antigens, a 0.1% solution of coomassie blue R250 was added for 90 minutes and stirred at room temperature. Subsequently, the stained suspension was washed by centrifugation and resuspension (5.900g) several times until the supernatant became colorless. The supernatant was discarded and a 0.1% BSA

solution was added. The stained antigens were stored in the freezer until use.

#### *Trapping of *L. amazonensis* promastigote antigens*

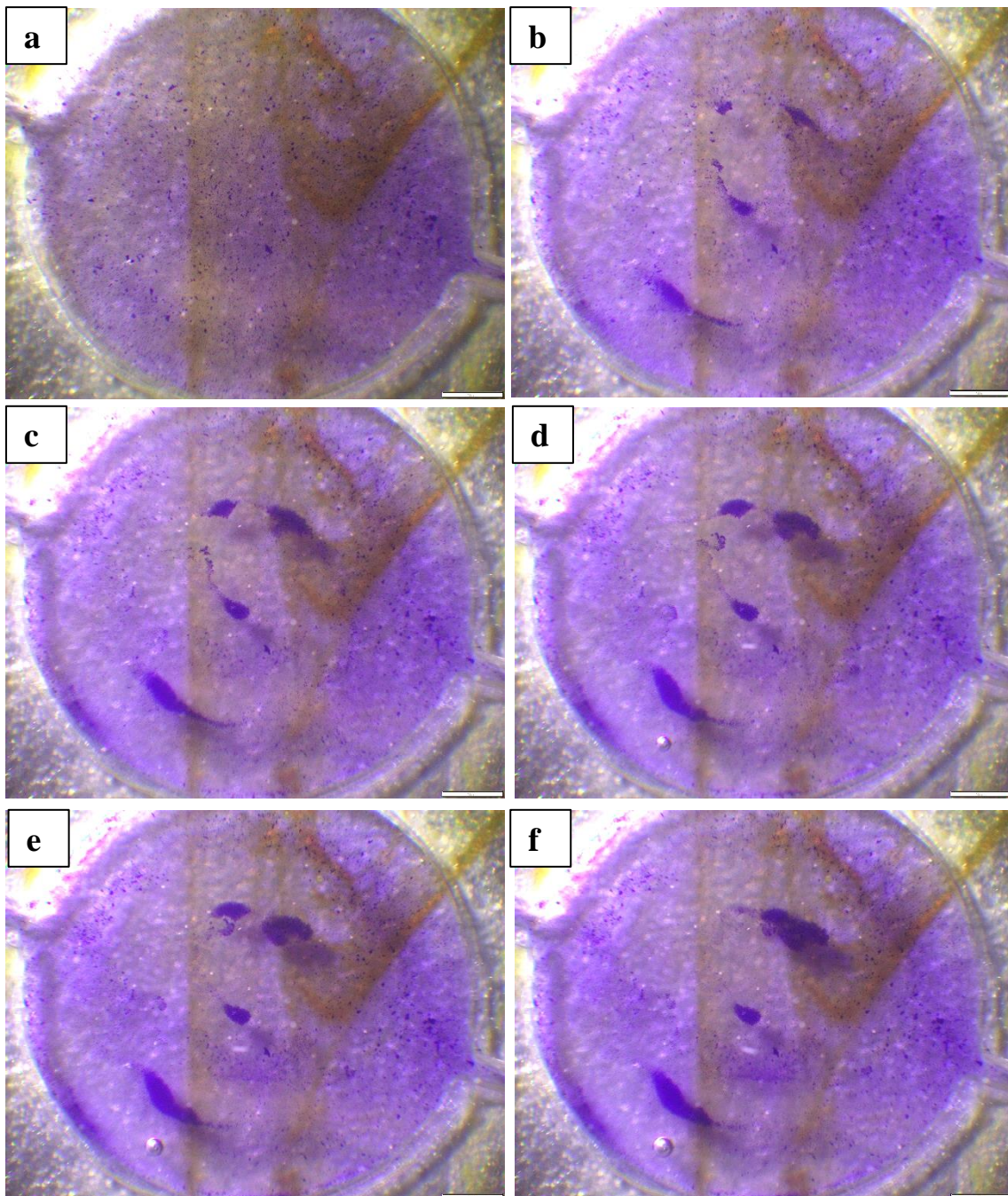
For the trapping of *L. amazonensis* promastigote antigens in the acoustofluidic device, 10 uL of the antigenic suspension were injected with the aid of a pipette in the well located in the device. Subsequently, the antigenic suspension was subjected to an ultrasound wave frequency of 3319 MHz and a pk-pk voltage of less than 5 volts, so that the antigens were trapped in the entrapment zone of the device. Images were captured every 5 minutes: T<sub>0</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>15</sub>, T<sub>20</sub>, T<sub>25</sub>, T<sub>30</sub>, T<sub>35</sub> and T<sub>40</sub>, for each analyzed sample.

#### *Evaluation of the efficiency of the direct immunoagglutination assay in an acoustofluidic device, using samples of saliva, urine, whole blood, serum and plasma*

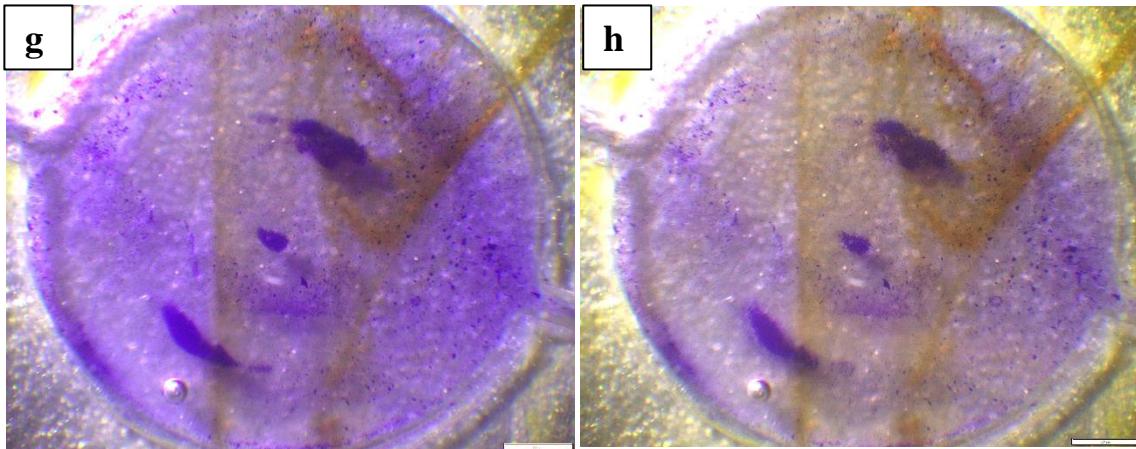
Biological samples (saliva, urine, whole blood, serum and plasma) from a positive and negative individual for cutaneous leishmaniasis were collected, processed and stored until the moment of use. To evaluate the effectiveness of the device, 10 µL of each sample collected was added to 10 µL of the antigenic suspension, the samples were homogenized and inserted into the acoustofluidic device for visualization in the microscope connected to the acoustofluidic device. The analysis was performed for 30 minutes with the device turned on and 10 minutes with the device turned off. Images were captured every 5 minutes: T<sub>0</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>15</sub>, T<sub>20</sub>, T<sub>25</sub>, T<sub>30</sub>, T<sub>35</sub> and T<sub>40</sub>, for each analyzed sample.

## Results

To demonstrate the capture capacity of the acoustofluidic device, samples of fragmented *L. amazonensis* antigens were produced and injected into the cavity of the device (bioreactor), which has dimensions of the order of millimeters. Inside the cavity, the antigens were subjected to wave frequency and the entrapment of the antigenic particles was verified from the optical microscope view, as shown in **Figure 1**.







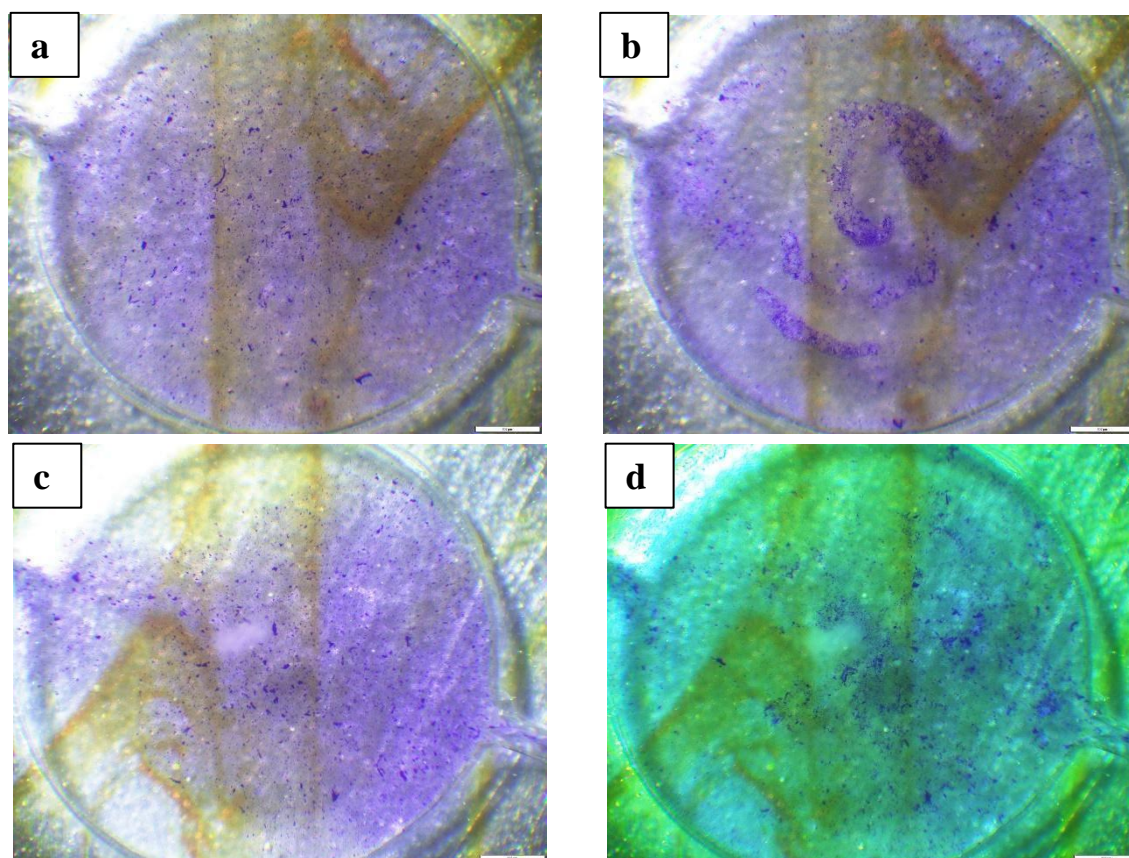
**Figure 1.** Antigens of stained *L. amazonensis* fragmented promastigotes being trapped in an acoustofluidics device at T<sub>0</sub> (a), T<sub>5</sub> (b), T<sub>10</sub> (c), T<sub>15</sub> (d), T<sub>20</sub> (e), T<sub>25</sub> (f), T<sub>30</sub> (g) e T<sub>40</sub> (h).

According to the tests carried out, the capture was remarkably performed, however, factors related to the density and concentration of antigenic particles seem to influence the capture start time. The more concentrated antigenic suspension was more easily captured than the more diluted suspension (1:3). In studies carried out with antigens from fragmented *L. amazonensis* promastigotes, entrapment began as soon as the suspension was injected into the device cavity, as shown in **Figure 1**. Once injected, the antigens are slightly concentrated in the capture region and soon after the first 5 minutes, it is possible to visualize a cluster of antigens in formation under the microscope.

In a continuous process, and while the ultrasound remains on, the antigenic particles continue to be attracted to the trapping zone. The results of the antigen capture time provide important data for the research, because to be considered a rapid test, the results must be produced in a maximum of 30 minutes. As shown in **Figure 1** (h), when the acoustofluidic device is turned off, the antigens seem to remain attracted, however, they fall on the levitation plane and the trapping zone is blurred under the microscope.

The figures below (**Figures 2, 3, 4, 5 and 6**) show fragmented *L. amazonensis* antigens (FLA) diluted (1:1) with the following samples collected from the leishmaniasis-positive and leishmaniasis-negative patient: saliva, urine, plasma, serum and whole blood, respectively. Visualization was performed on the device's camera at different analysis times: (a) Initial time (T<sub>0</sub> min) and final time (T<sub>30</sub> min).

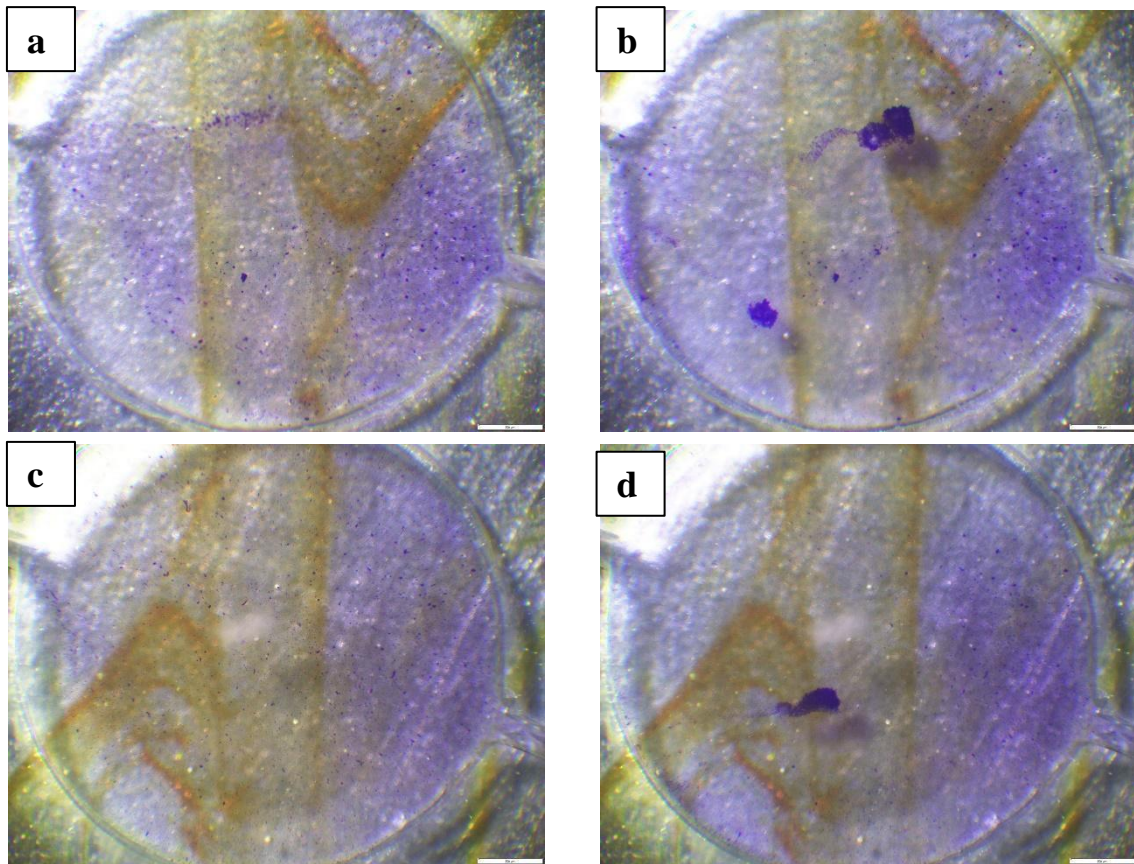
In **Figure 2**, it is possible to observe some difference in the agglomeration pattern obtained between the sample of positive and negative individuals for leishmaniasis. In **Figure 2-b** the clustering pattern appears to be more intense than in the negative sample (**Figure 2-d**). This different agglomeration pattern in saliva can be influenced by saliva density, since when inserted into the device, the sample presented a certain resistance when passing through the microcavity.



**Figure 2.** FLA + saliva from a positive individual in (a) T<sub>0</sub> and (b) T<sub>30</sub> and FLA + saliva from a negative individual in (c) T<sub>0</sub> and (d) T<sub>30</sub>

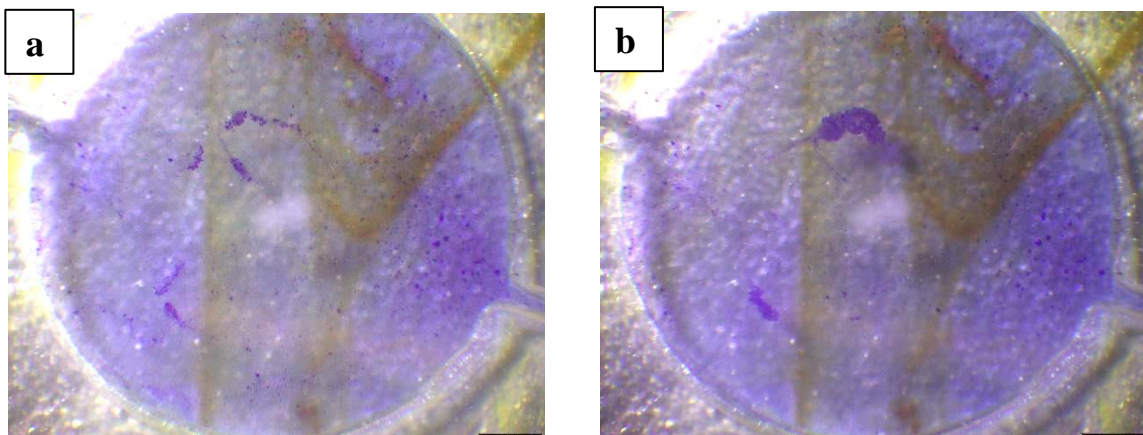
**Figure 3** shows a pattern of antigen trapping that is different from the pattern observed in the saliva sample. In the sample from an individual positive for leishmaniasis (**Figure 3-b**) there is formation of two trapping zones and the particles seem more united than in the previous sample. However, when compared with the urine sample of the individual negative for leishmaniasis (**Figure 3-d**), the trapping pattern was very similar, however with the formation of a single trapping zone.



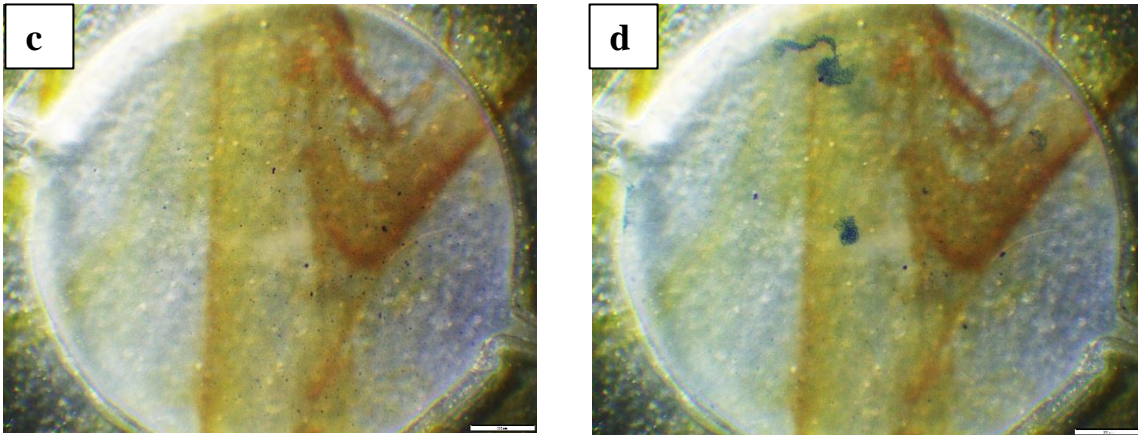


**Figure 3.** FLA + urine from a positive individual in (a) T<sub>0</sub> and (b) T<sub>30</sub> and FLA + urine from a negative individual in (c) T<sub>0</sub> and (d) T<sub>30</sub>

In **Figure 4** it is possible to observe the difference in the trapping pattern between the plasma of the positive and negative individual for leishmaniasis. Comparing the initial trapping time, it is possible to observe that the positive sample (**Figure 4-a**) seems to cluster faster than the negative sample (**Figure 4-b**). However, at the final time (**Figures 4 – b and d**) both samples had their particles agglomerated in the device.

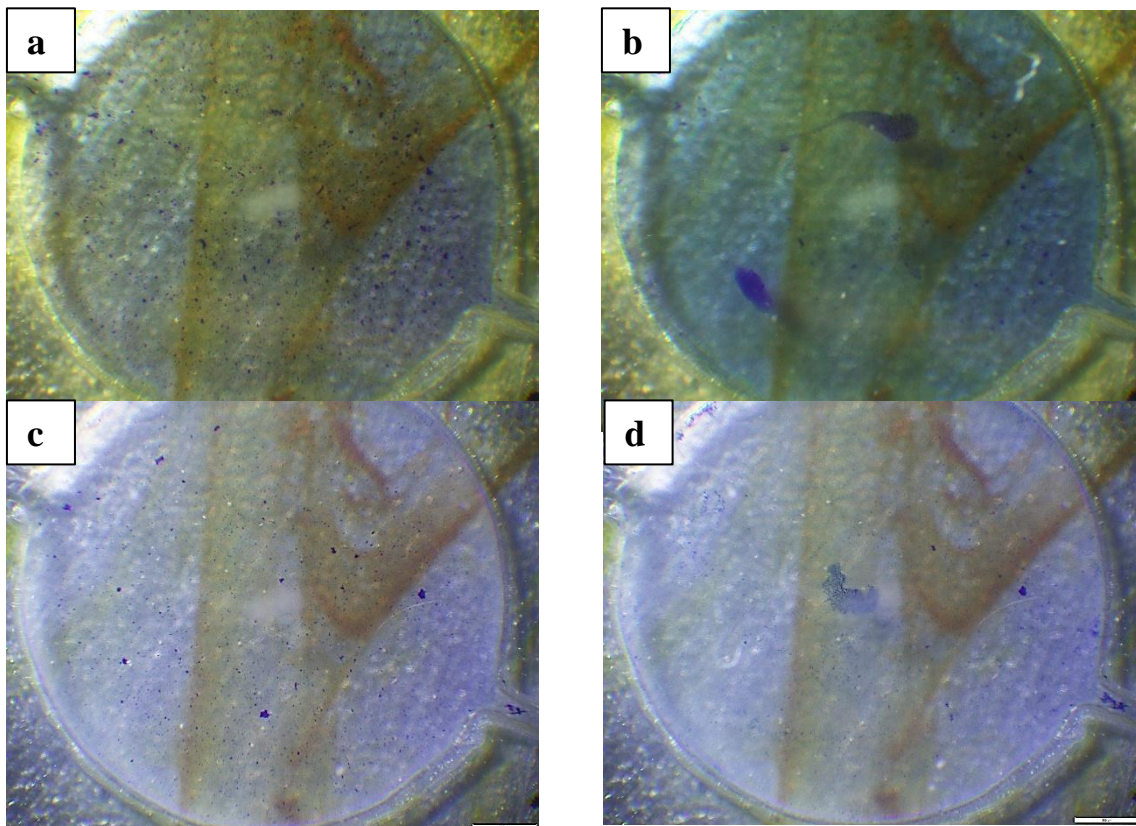






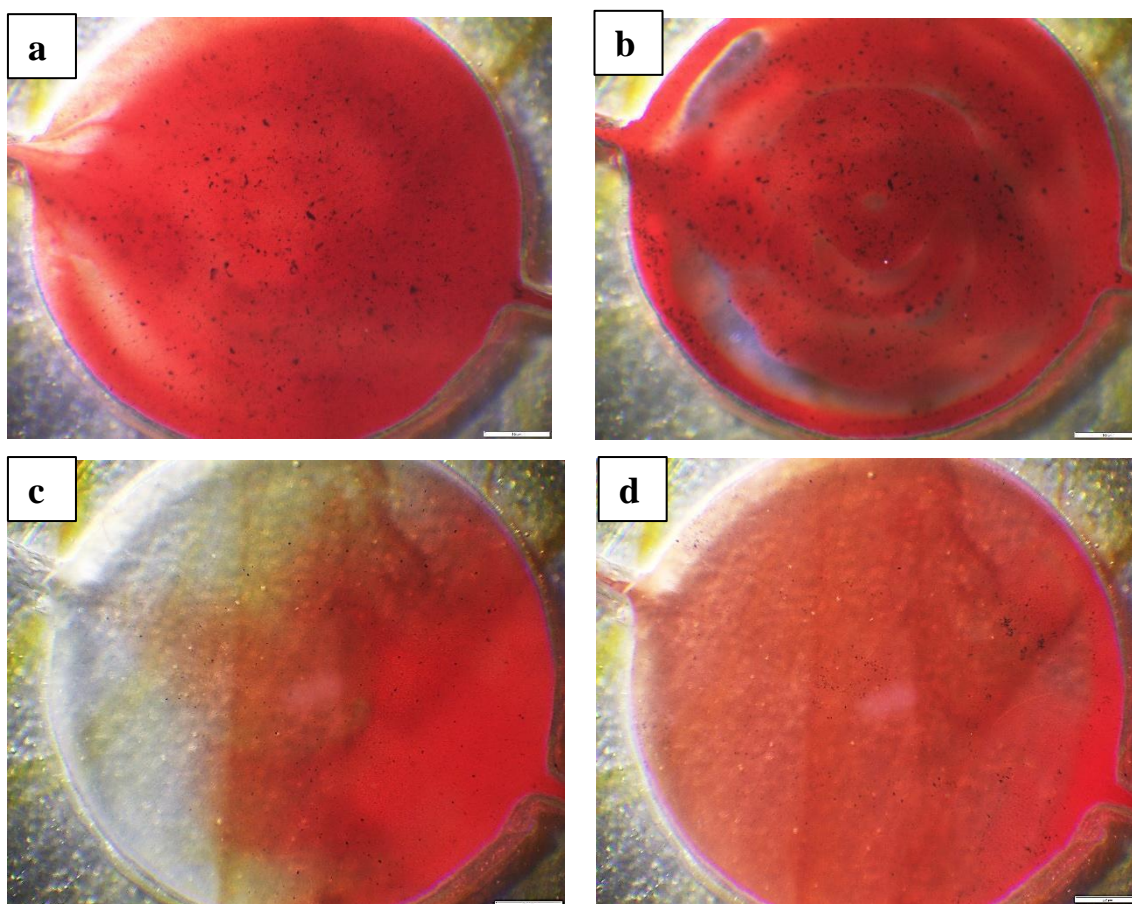
**Figure 4.** FLA + plasma from a positive individual at (a)  $T_0$  and (b)  $T_{30}$  and FLA + plasma from a negative individual at (c)  $T_0$  and (d)  $T_{30}$

**Figure 5** shows the trap pattern of serum samples from positive and negative individuals for leishmaniasis. The initial time (**Figures 5 – a and c**) is very similar in both samples, but in the final time the positive sample has two trapping zones and the negative sample only one trapping zone. However, for both samples the device trapped the particles, demonstrating a similar agglomeration pattern between the evaluated samples.



**Figura 5.** FLA + soro de indivíduo positivo em (a) T<sub>0</sub> e (b) T<sub>30</sub> e FLA + soro de indivíduo negativo em (c) T<sub>0</sub> e (d) T<sub>30</sub>

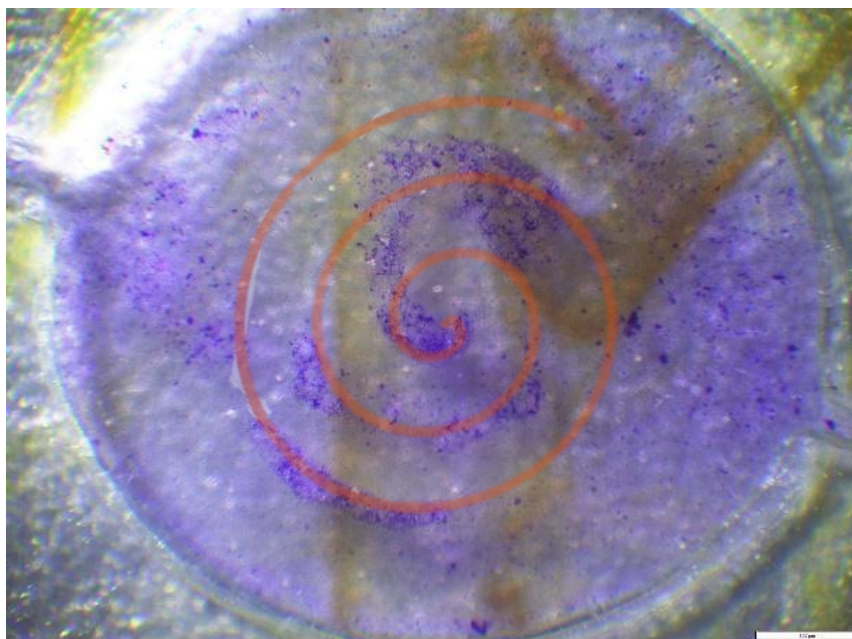
In samples containing whole blood, trapping showed a different pattern than the other samples. It is believed that, due to the presence of many red blood cells, the trapping of antigens is not as pronounced as in the other samples. After a period of 30 minutes, it is possible to observe an agglomeration of red cells next to the antigens, which was more visible in the sample from the positive individual than in the sample from the negative individual for leishmaniasis.



**Figura 6.** FLA + sangue total de indivíduo positivo em (a) T<sub>0</sub> e (b) T<sub>30</sub> e FLAD + sangue total de indivíduo negativo em (c) T<sub>0</sub> e (d) T<sub>30</sub>



It is worth mentioning that a common characteristic of all the evaluated samples is the aggregation of antigenic particles with a tendency to form a very similar geometric arrangement, especially among the positive samples, in a honeycomb or spiral format, evidencing the acoustic movement produced by the device, as shown in the figure below (**Figure 7**).



**Figure 7.** Geometric honeycomb arrangement

## **Discussion**

Although there are studies on new diagnoses for leishmaniasis, there is still no technique available that facilitates its routine use, and there is a need to develop a faster, more effective, safer, simpler and less expensive diagnostic method, in addition to being innocuous and reliable, essential conditions to make it accessible, scalable and universal. Cases, the discovery of new useful diagnostic methods, especially leishmaniasis, represent a greater facility in the national health sector, allowing a greater ease of monitoring the methods of the disease.

Several serological tests have been developed to detect antibodies to *Leishmania*

spp. in blood or serum, being a method commonly used in direct agglutination tests (DATs). DATs use antigens prepared from dead promastigotes and linked to blue markers to read the assay (21). In this context, the combination of DATs with acoustofluidic technology is of particular importance for the diagnosis of diseases, since when the mixture between antigens and the patient's sample is injected into the acoustofluidic device, ultrasound increases the probability of collisions between antigens and antibodies. Thus, increasing the interaction between them and decreasing the reaction time for the formation of the antigen-antibody complex (16).

The results of the preliminary analyzes were promising, demonstrating that through acoustofluidics the device showed the capacity to capture fragmented antigens of *L. amazonensis*, which are crucial elements of the diagnostic test proposed here. The literature describes the study of microfluidics in parasitic diseases for diagnostic and therapeutic purposes, but this is the first time that a prototype acoustofluidic device has been used for diagnostic purposes for cutaneous leishmaniasis, using the principle of immunoagglutination (24, 25).

The parasitic movement of promastigotes and amastigotes of *Leishmania* spp. exposure to ultrasonic standing waves were studied using an acoustofluidic device. The authors observed that the two evolutionary forms of *Leishmania* spp. were trapped in the pressure node located in the center of the channel, presenting different forms and stability conditions between the two evolutionary forms (22). The acoustic entrapment of macrophages was also evaluated, considering that they are cells commonly used in assays of infection by *L. amazonensis* for the purpose of discovering new drugs for the treatment of leishmaniasis. The authors confirm the advantages of using acoustofluidic devices, as they have a simple manufacturing process, using low-cost materials and simple handling. and the formation of stable cell clusters, with a fast and satisfactory response time, therefore, they have great potential for diagnostic and therapeutic purposes (23).

The improvement of immunoassays using ultrasonic waves is a recent technology and has been studied for two types of immunoassays: agglutination and fluorescence. For this purpose, polystyrene particles functionalized with antibodies are used to attract and concentrate antigens. The ultrasound then serves to increase the probability of collision of these particles, trapping them in the pressure nodes of the standing wave.

Consequently, the speed rate and sensitivity of the test is increased (13).

In the present study, after the first analyzes of the functioning of the device, it was possible to observe that the acoustic force in the device ends up agglomerating the antigens in both positive and negative samples. Although there are no significant differences from the point of view of qualitative analysis between positive and negative samples, there are numerous predicted possibilities that can be better studied and better understood, according to these first observations.

Changes to the device, such as voltage and amplitude, can bring better results and do not rule out the possibility of the proposed device becoming a general-purpose platform, with a variety of applications for life sciences, diagnostic medicine and biotechnology. Determining the conditions to avoid this agglomeration in samples from individuals without the disease is a challenge to be considered, and an image standard must be established that can more clearly define a positive sample from a negative sample. Immunoagglutination assays using acoustofluidic devices still have great potential and appear to be very suitable for implementation in the lob-on-a-chip format (13).

## **Conclusions**

The results demonstrated here reinforce the capture capacity of the acoustofluidic device, now capturing and levitating antigens quickly and using a low sample volume of *L. amazonensis* antigens, produced from fragmented promastigotes. The initial evaluation of the efficiency of the device for application in the rapid immunoagglutination test for cutaneous leishmaniasis is still inconclusive. The image pattern between negative and positive samples is very similar and reveals a limitation that the technique has, but which can be remedied by modifying the device and continuing the study. Acoustofluidic technology is a new methodology and has great potential and applicability in the development and improvement of diagnostic tests.

## **Conflicts of interest**

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos for kindly providing the promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016). The authors would also like to thank the CAPES, CNPq, INCT-INOVAR, MCTC, FINEP, and FAPEAL. Moreover, the authors would like to thank several colleagues working at the UFAL for constructive criticism of and assistance with this project.

## Funding

This work was supported by the Institutional Program for Scientific Initiation Scholarships (CNPq, FAPEAL and Federal University of Alagoas), and Decit/SCTIE/MS, CNPq, FAPEAL e da SESAU-AL (PPSUS 06/2020, N° 60030.0000000194/2021).

## References

1. ANVERSA, L.; TIBURCIO, M.G.S.; RICHINI-PEREIRA, V.B. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
2. BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 92, n. 10151, p. 951-970, 2018.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Available in: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Accessed on: June 05, 2022.
4. LEITE, A.B. Epidemiological aspects of leishmaniasis in Alagoas and evaluation of the leishmanicidal activity of triazole nitrophenyl derivatives. Doctoral thesis – Postgraduate Program in Health Sciences – Federal University of Alagoas. 2018
5. VAN-GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in

Diagnostics and Treatment Regimens. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, v. 33, p. 79– 99, 2019.

6. VON-STEBUT, E. Leishmaniasis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, v. 13, n. 3, p.191–200, 2015.

7. DUTHIE, M.S.; LISON, A.; COURTENAY, O. Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, v. 34, p. 881–890, 2018.

8. MONTEIRO, F.M.; MACHADO, A.S.; ROCHA-SILVA, F. et al. Canine visceral leishmaniasis: detection of *Leishmania* spp. genome in peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). *Microb. Pathog.*, v.126, p. 263–268, 2018.

9. NUNES, C.M.; LIMA, V.M.; MELO, G.D. et al. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 24, p. 402–409, 2015.

10. SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J. Vector Borne Dis.*, v. 53, n. 1, p. 8-16, 2016.

11. COSTA, L.E.; SALLES, B.C.; ALVES, P.T. et al., New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. *J. Immunol. Methods*, v. 434, p 39–45, 2016.

12. LIMA, M.P.; COSTA, L.E.; DUARTE, M.C. et al., Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. *Parasitol. Res.*, v. 116, p. 1197–1206, 2017.

13. MUKHTAR, M.; ABDOUN, A.; AHMED, A.E. et al. Diagnostic accuracy of rK28-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis: a prospective clinical cohort study in Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 109, p. 594–600, 2015.

14. SOUZA-FILHO, J.A.; BARBOSA, J.R.; FIGUEIREDO, F.B. et al. Performance of Alere™ immunochromathographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v. 225, p.114–116, 2016.
15. MAURELLI, M.P.; BOSCO, A.; MANZILLO, V.F. et al. Clinical, Molecular and Serological Diagnosis of Canine Leishmaniosis: An Integrated Approach. *Vet. Sci.*, v. 7, p. 43, 2020.
16. WIKLUND, M.; RADEL, S.; HAWKES, J.J. Acoustofluidics 21: ultrasoundenhanced immunoassays and particle sensors. *Lab Chip*, v. 13, p. 25-39, 2013.
17. ASAD, M.; BHATTACHARYA, P.; BANERJEE, A.; ALI, N. Therapeutic and immunomodulatory activities of short-course treatment of murine visceral leishmaniasis with KALSOME10, a new liposomal amphotericin B. **BMC Infect Dis.**, v. 15, p. 188, 2015.
18. GARCEZ, Lourdes M.; SHAW, Jeffrey J.; SILVEIRA, Fernando T. Teste de aglutinação direta no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral no estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 2, p. 165-180, 1996.
19. Lawyer PG, Young DG, Butler JF, Akin DE. Developmental of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1987; 24:347-55.
20. MIRANDA, José Carlos et al. Studies on the influence of the presence of domestic animals on increasing the transmission probabilities of Leishmaniasis. 2008.
21. KÜHNE, V.; BÜSCHE, P. The Unknown Nature of the Antigen in the Direct Agglutination Test for Visceral Leishmaniasis Hampers Development of Serodiagnostic Tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 100, p. 2, p. 246–255, 2019.
22. JIMÉNEZ, Abelino Vargas et al. Acoustophoretic Motion of *Leishmania* spp.



Parasites. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 48, n. 7, p. 1202-1214, 2022.

23. SANTOS, Harrison DA et al. 3D-Printed Acoustofluidic Devices for Raman Spectroscopy of Cells. **Advanced Engineering Materials**, v. 23, n. 10, p. 2100552, 2021.

24. POURABED, Amir et al. A star shaped acoustofluidic mixer enhances rapid malaria diagnostics via cell lysis and whole blood homogenisation in 2 seconds. **Lab on a Chip**, v. 22, n. 9, p. 1829-1840, 2022.

25. ZHOU, Jason et al. based acoustofluidics for separating particles and cells. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 12, p. 8569-8578, 2020.

### 5.3 Produto 3

#### Evaluation of the leishmanicidal activity of naphthoquinone derivatives

Lilyana Waleska Nunes Albuquerque<sup>a¶</sup>, Silvia Helena Cardoso<sup>b¶</sup>, Alysson Wagner Fernandes Duarte<sup>c#</sup>, Magna Suzana Alexandre-Moreira<sup>a&</sup>, Aline Cavalcanti de Queiroz<sup>a,c&\*</sup>

<sup>a</sup>*Laboratório de Farmacologia e Imunologia- Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, CEP:57072-900, Maceió – AL, Brasil*

<sup>b</sup>*Laboratório de Química Orgânica e Síntese Medicinal - - Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Núcleo de Ciências Exatas, Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, CEP: 57309-005, Arapiraca-AL, Brasil*

<sup>c</sup>*Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Centro de Ciências Médicas e de Enfermagem, Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, CEP: 57309-005, Arapiraca-AL, Brasil*

\*Address for correspondence: Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Setor de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, Maceió, AL, CEP: 57072-900, Brazil.

Tel: +55 82 32141527.

\*Corresponding Author:

Aline Cavalcanti de Queiroz, [aline.queiroz@arapiraca.ufal.br](mailto:aline.queiroz@arapiraca.ufal.br)

Magna Suzana Alexandre-Moreira, [suzana.magna@gmail.com](mailto:suzana.magna@gmail.com)

† These authors contributed equally to this work.

¶ These authors contributed equally to this work.

& These authors also contributed equally to this work.

Declarations of interest: none

## Evaluation of the leishmanicidal activity of naphthoquinone derivatives

### Abstract

Leishmaniasis is an endemic parasitosis in 102 countries and territories, caused by a protozoan of the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of a sandfly during a blood meal. The disease has different clinical forms, from cutaneous lesions to systemic involvement. The therapeutic arsenal for the treatment is quite limited, due to low safety and high levels of resistance. Faced with the need to develop new, more efficient and safer leishmanicidal drugs, this work proposed to investigate the leishmanicidal activity of three 1,4-naphthoquinone derivatives, planned as cysteine protease inhibitors, a crucial enzyme for parasite survival. Therefore, the cytotoxic potential of the derivatives was evaluated through the cell viability assay, using MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). The results of the in vitro cell viability assay showed that the JN16 and JN17 derivatives induced a cytotoxic effect in the host cell, while the JN22 derivatives did not show a cytotoxic effect up to the maximum concentration tested, 30 µg/mL. The derivatives were active against the promastigotes forms of *L. chagasi* and *L. amazonensis*, especially the compound JN22, which showed IC<sub>50</sub>, maximum effect and selectivity index with results superior to the standard drug. New studies must be carried out to prove the leishmanicidal effect of the compounds via inhibition of cysteine proteases of *Leishmania* spp parasites.

**Keywords:** Leishmanicidal. Naphthoquinones. *Leishmania*. Cysteine protease.

## 1. Introduction

Leishmaniasis is affected by protozoa of the Trypanosomatidae family, of the genus *Leishmania*. Currently, more than 20 species of *Leishmania* are known to be transmitted through the bite of infected sandflies. Leishmaniasis is divided into three main types: visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (CML) (WHO, 2022). In 2019, leishmaniasis became endemic in 102 countries and territories, causing the death of 20 to 30 thousand people per year. About 310 million people live in areas at high risk of infection with leishmaniasis, and it is a disease classified by the WHO as one of the five largest parasitic diseases in the world (ALVAR et al, 2012; WHO, 2022; OPAS, 2019).

Since the 1950s, the drugs of choice for treatment have been pentavalent antimonials (Pentostam® and Glucantime®), administered parenterally. The second line of treatment for leishmaniasis consists of amphotericin B (conventional or liposomal), pentamidine and miltefosine, the latter being the only drug administered orally (VAN-GRIENSVEN, 2012; CHÁVEZ-FUMAGALLI, 2015). Drug therapy must be chosen carefully, as the fight against parasites considers the species of *Leishmania* involved, as well as the clinical form of the disease, the characteristics of the lesions and the individual's immune system (STEBUT, 2015).

Due to the limitations of these drugs in terms of low safety and efficacy, high rates of toxicity and cost, there is a need to develop new, more effective leishmanicidal agents, with a high therapeutic index, easy administration, selective and able to promote activation of the immune system. properly, as a form of defense against parasites (BASTOS, et al., 2016; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

The prospection of new therapeutic targets can impact the success of drug therapy for leishmaniasis. Some targets have already been studied, such as new opportunities for the eradication of the parasite: alteration in the parasite's metabolic pathways (glycolysis, metabolism of fatty acid and sterol, folate, polyamines, nucleotides and antioxidants), modulation of antimicrobial peptides expressed during infection, proteasome inhibition, inhibition of the parasite's secretory proteins and enzymatic inhibition, especially of cysteine protease, which plays a crucial role in the survival of the parasites, by interfering with the virulence of the parasite, maintenance of the viability and morphology of the parasite, invasion of the host's mononuclear phagocytic system and the modulation of the immune response (SUNDAR; SINGH, 2018; SILVA et al., 2021).

In this context, the molecules derived from the quinone class are very promising in the design of bioactive compounds, such as naphthoquinones. Naphthoquinones are a subgroup of quinones, with antibacterial, antifungal and antiprotozoal properties well reported in the literature (MENDONÇA et al., 2022; ORTIZ-PÉREZ et al., 2021). Lapachol and  $\beta$ -lapachol are classical naphthoquinone derivatives extracted from trees belonging to the genus *Tabebuia*. Popularly, indigenous people use these plants to treat infections of parasitic origin (SILVA et al., 2021).

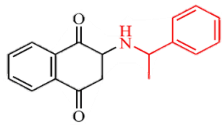
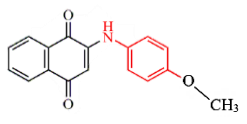
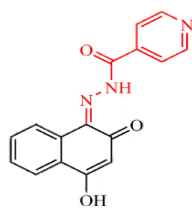
A series of 1,4-naphthoquinones derivatives, intended as inhibitors of trypanosomatid cysteine proteases, showed interesting activity against cruzain and rhodopsin, which play a vital role in these parasites (SILVA et al., 2021). This fact motivated the continuation of the studies in the evaluation of the antiparasitic activity with this series of derivatives. Thus, the objective of this study was to evaluate the cytotoxic activity of naphthoquinone derivatives against host cells of *Leishmania* spp. parasites, aiming at a screening for the selection of viable molecules with potential leishmanicidal activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Obtaining naphthoquinone derivatives

The derivatives were synthesized again by Prof. Dr. Sílvia Helena Cardoso, according to Silva et al. (2021). Three substances derived from naphthoquinones (**Table 1**) were listed for the in vitro experiments at the Laboratory of Pharmacology and Immunity (LaFI) of the Federal University of Alagoas (Campus A. C. Simões). The derivatives were weighed and diluted in 0.1% DMSO and the solutions sterilized on a filter (0.22  $\mu$ m), obtaining stock solutions at a concentration of 10 mg/mL. These solutions were stored and refrigerated until the use of pharmacological experiments.

**Table 1.** Chemical structure of compounds synthesized and evaluated in the study

| Chemical compost | Chemical structure   |
|------------------|--|
| JN-16            |  |
| JN-17            |  |
| JN-22            |  |

## 2.2 Biological Assays

### 2.2.1 J774.A1 murine macrophage culture

Macrophages of the J774.A1 strain were preserved in culture bottles in 10 ml of RPMI medium (Roswell Park Memorial Institute-1640) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum – Roche), L-glutamine, pyruvate and non-essential amino acids, kept in study at 37°C with 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. At the time of use, the cells were centrifuged for 5 minutes at 1500 RPM at 4°C and counted in a Neubauer chamber and subsequently adjusted in RPMI medium supplemented with FBS at a concentration of 1 x 10<sup>5</sup> cells/mL, in which they were 200 µL of this suspension was poured into a 96-well plate (Nunc, Denmark).

### 2.2.3 Cytotoxicity assay

Macrophages of the J774.A1 strain were previously cultured in triplicates in 96-well plates, at a concentration of 3 x 10<sup>4</sup> cells/well and incubated in an oven at 37 °C with a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours, so that there was adhesion. of cells at the bottom of the wells. Then, the wells were washed to remove non-adherent macrophages and 200 µL of synthetic compounds previously diluted in RPMI medium at concentrations of 30, 10, 3, 1, 0.3

and 0.1 mg/mL were added to each well. In the control wells, cells were cultured only with culture medium and compounds diluent (DMSO, Sigma). Cell viability was determined by the MTT reduction assay (MOSMANN, 1983). The viability of the cells treated with the compounds was compared to the pattern of death obtained in the control cultures.

#### 2.2.4 Viability assay of *Leishmania* spp.

The promastigotes forms of *L. chagasi* and *L. amazonensis* were centrifuged and resuspended in Schneider medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine and 2% human urine, to obtain a concentration of  $1 \times 10^5$  parasites/ml. Then, 100 $\mu$ L aliquots of this suspension were distributed in a 96-well plate. The wells received treatment with synthetic substances at different concentrations (30, 10, 1, 3, 0.3 and 0.1 mg/mL) and amphotericin b (100 to 0.001  $\mu$ M), as well as the DMSO vehicle control (0.2%) prepared in supplemented Schneider medium, to reach a final volume of 200 $\mu$ L per well. The plate was then incubated in a BOD oven at 27°C for a period of 48 hours. The number of parasites was determined using a Neubauer chamber under an optical microscope. The inhibition caused by each substance was expressed as a percentage in relation to the cells cultivated only in the presence of the DMSO vehicle.

#### 2.2.5 Determination of the selectivity index (SI)

The selectivity index is a crucial parameter in the investigation of leishmanicidal substances, as it has accepted how much its cytotoxic effect will be selective for the parasite, without implying the death of the host cell. The selectivity index is calculated using the ratio between the inhibitory concentration of 50% of the growth of macrophages and parasites (DE MUYLDER et al, 2011).

#### 2.2.5 Statistical analysis

Data tabulation was performed using GeaphPad Prisma® software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA Statistical), where significance levels between experimental groups and positive or negative controls were evaluated, using ANOVA analysis of variance, followed by

the Dunnett post-test. Values were considered significant when \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  and expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

### 3. Results

#### 3.1 Cytotoxicity against host cells

Before evaluating the leishmanicidal potential of naphthoquinone derivatives, the cytotoxicity of the compounds against host cells of *Leishmania* spp. was investigated using the MTT colorimetric assay. For this purpose, macrophages belonging to the J774.A1 lineage were treated with the three derivatives at the respective concentrations, 30, 10, 3, 1, 0.3 and 0.1  $\mu\text{g/ml}$  for a period of 48 hours. From this, it was possible to trace the inhibitory concentration of 50% and the maximum effect for each compound evaluated, as shown in Table 2.

**Table 2.** Cytotoxicity of synthetic naphthoquinone derivatives on J774.A1 macrophages (MTT assay).

| <i>Derivate</i>       | <i>IC<sub>50</sub><sup>a</sup></i> | <i>Maximum effect (%) <math>\pm</math> S.E.M.<sup>b</sup></i> |
|-----------------------|------------------------------------|---|
| <i>Amphotericin B</i> | 0.61 $\mu\text{g/mL}$              | 66.56 $\pm$ 2.42  |
| <i>JN16</i>           | 0.34 $\mu\text{g/mL}$              | 54.67 $\pm$ 3.14  |
| <i>JN17</i>           | 0.11 $\mu\text{g/mL}$              | 67.59 $\pm$ 5.53  |
| <i>JN22</i>           | >30 $\mu\text{g/mL}$               | ND  |

The results revealed the cytotoxic effect of the standard drug amphotericin B ( $\text{IC}_{50} = 0.61 \mu\text{g/mL}$  and Maximum effect =  $66.56 \pm 2.42\%$ ), respectively. Furthermore, of the three naphthoquinone derivatives tested here, only JN-16 and JN-17 induced cytotoxic effect in host cells with  $\text{IC}_{50} = 0.34 \mu\text{g/mL}$  and  $0.11 \mu\text{g/mL}$  and maximum effect =  $54.67 \pm 3.14$  and  $67.59 \pm 5.53$ , respectively.

The naphthoquinone derivatives were then evaluated for leishmanicidal activity against



the parasites *L. chagasi* and *L. amazonensis*. The parasites were seeded and treated at different concentrations (30, 10, 3, 1, 0.3 and 0.1 µg/ml) for a period of 48 hours. Three important aspects were analyzed in the study of the leishmanicidal activity of the compounds: the inhibitory concentration of 50%, the potency through the maximum effect and the selectivity index, a crucial parameter in the investigation of leishmanicidal substances that resisted how selective their cytotoxic effect will be for the parasite, without implying the death of the host cell.

As shown in Table 3, the three compounds tested showed antiparasitic activity against the promastigotes forms of *L. chagasi*, with emphasis on the derivative JN22 which, in addition to not being cytotoxic for macrophages, showed an  $IC_{50} = 1.64 \mu\text{g/mL}$  against *L. chagasi*, with maximum effect =  $100 \pm 0.00$  \*\*\*, proving to be 18 times more selective for the parasite than for the host cell.

**Table 3.** Effect of naphthoquinone derivatives on the viability of *L. chagasi* promastigotes.

| <i>Derivate</i>       | $IC_{50}^a$ | <i>Maximum effect</i><br>(%) $\pm$ S.E.M. <sup>b</sup> | <i>Selectivity index (SI)<sup>c</sup></i> |
|-----------------------|-------------|--|---|
| <i>Amphotericin B</i> | 0.30 µg/mL  | 100 $\pm$ 0.00 ***                                     | 2.03                                      |
| <i>JN16</i>           | 5.69 µg/mL  | 82.4 $\pm$ 4.00 ***                                    | 0.05                                      |
| <i>JN17</i>           | 0.18 µg/mL  | 96.0 $\pm$ 2.88 ***                                    | 0.61                                      |
| <i>JN22</i>           | 1.64 µg/mL  | 100 $\pm$ 0,00 ***                                     | >18.29                                    |

All derivatives were able to inhibit promastigotes of *L. amazonensis* in a statistically significant way, with emphasis also on derivative JN22 ( $IC_{50} = 5.07 \mu\text{g/mL}$ ; maximum effect =  $100 \pm 0.00$  \*\*\*). In addition, the derivative JN22 also demonstrated selectivity higher than 5.91 against *L. amazonensis*, being as selective or more than amphotericin B, as shown in table 4. The standard drug amphotericin B inhibited, at the maximum tested concentration,  $100.00 \pm 0.00\%$  of the growth of *Leishmania* parasites of both species, presenting  $IC_{50}$  of  $0.30 \mu\text{g/mL}$  and  $0.12 \mu\text{g/mL}$  against *L. chagasi* and *L. amazonensis*, respectively.

**Table 4.** Effect of naphthoquinone derivatives on the viability of *L. amazonensis* promastigotes.

| <i>Derivate</i>       | <i>IC</i> <sub>50</sub> <sup>a</sup> | <i>Maximum effect</i><br>(%) ± S.E.M. <sup>b</sup> | <i>Selectivity index (SI)</i> <sup>c</sup> |
|-----------------------|--------------------------------------|--|--|
| <i>Amphotericin B</i> | 0.12 µg/mL                           | 100 ± 0.00 ***                                     | 5.08                                       |
| <i>JN16</i>           | 6.25 µg/mL                           | 100 ± 0.00 ***                                     | 0.05                                       |
| <i>JN17</i>           | 1.25 µg/mL                           | 100 ± 0.00 ***                                     | 0.08                                       |
| <i>JN22</i>           | 5.07 µg/mL                           | 100 ± 0.00 ***                                     | > 5.91                                     |

#### 4. Discussion

The absence of new drugs for the treatment of leishmaniasis brings a huge concern in the eradication of this parasitosis. The development of new leishmanicidal drugs that are more effective and less cytotoxic is crucial, as it is one of the main parts of the treatment. Naphthoquinones are part of a chemical group that has been extensively studied in the field of medicinal chemistry due to their antitumor, anti-inflammatory and antiparasitic properties well described in the literature. As previously described, cytotoxicity is a limiting factor for the use of naphthoquinone derivatives, therefore, it is important to evaluate the selectivity profile of this cytotoxicity, to establish a risk *versus* benefit ratio of these derivatives (ELLENDORFF et al., 2015). Here, three 1,4-naphthoquinone derivatives were evaluated in order to establish the cytotoxic effect against macrophage cells.

The cell viability assay using MTT consists of a colorimetric technique capable of measuring the mitochondrial activity of viable cells. Mitochondrial activity is quantified by spectrophotometry (550 nm) through the reduction of MTT, catalyzed by the enzyme succinate dehydrogenase of viable cells, resulting in the formation of formazan crystals. MTT has a yellow color and when metabolized, it becomes purple due to the formation of crystals (MOSMANN, 1983). According to Mosmann (1983), the test detects only living cells,

therefore, it can be applied to measure cytotoxicity, proliferation or cell activation. The technique has several advantages due to its shorter processing time, being able to quantify many samples accurately, being a sensitive and reproducible test, easy to perform, in addition to replacing other methods, such as the test that uses radioisotopes.

Previous studies have shown that the classic naphthoquinone, lapachol, induces cytotoxicity to murine macrophages ( $184.65 \pm 6.58 \mu\text{g/mL}$ ). Alterations in the structure of lapachol may be interesting and an alternative way to decrease the cytotoxicity of this compound, keeping its parasitic activity preserved or even higher. When associated with the metal, lapachol decreases its cytotoxicity, due to the increased lipophilicity of complexed lapachol (ROCHA et al., 2013). In rat skeletal myoblasts, lapachol also induced a cytotoxic effect ( $\text{IC}_{50} = 26.57 \mu\text{M}$ ) (ELLENORFF et al., 2015).

Our results showed that the derivatives JN16 and JN17 presented cytotoxicity similar when compared to amphotericin B, while JN22 was not cytotoxic to the host cell. Derivatives JN16 and JN17 are structurally correlated, containing nitrogenous substituents at position 2 and due to this structural similarity, both showed cytotoxic effects on macrophages. However, there is a 1-phenylethylamino group in the JN16 derivative, structurally differing from the JN17 derivative, which has a methoxy group in place of the aniline ring, which also confers significant cytotoxicity. Although the JN22 derivative also has a nitrogen substituent, it differs from the others due to the position of the substituent, in this case the nitrogen is in position 1, conferring the absence of cytotoxicity to this molecule.

The toxicity of naphthoquinones can be quite variable depending on the radicals available in the molecules of their derivatives (DE SENA PEREIRA et al., 2016). Kishore et al. (2014) tested seven naphthoquinone compounds, of which two were less toxic ( $188.7$  and  $54 \mu\text{M}$ ), while the other five compounds were more toxic ( $18.4 \mu\text{M}$ ). The cytotoxicity of naphthoquinones can be explained by the cellular nucleophilic reaction, due to the electrophilic nature of this chemical class, or by the formation of semiquinones that auto-oxidize the quinone, producing reactive oxygen species, which end up generating a highly oxidative environment. (KUMAGAI et al., 2012; EHRHARDT et al., 2013).

Naphthoquinones and their derivatives are promising in the study of new antiparasitic drugs, as there are several studies in the literature showing the inhibitory capacity of these compounds against parasites such as *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. (PINTO et al., 2014). Due to these pharmacological activities, the popular use

of naphthoquinones is quite usual. The mechanism by which naphthoquinones exert such activities seems to be related to their ability to inhibit electron transporters, uncouplers of oxidative phosphorylation, intercalating agents in the double helix, acting as alkylating agents, bioreducers of biomolecules and producers of reactive oxygen species (BABULA et al., 2009).

For example, a series of 27 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone compounds were active against *L. chagasi* parasites (DE ARAÚJO et al., 2017). Two naphthoquinones were able to inhibit the growth of *L. donovani* in both promastigotes and amastigotes, with  $IC_{50} = 5.4 \pm 2.4$  and  $7.04 \pm 0.15 \mu\text{M}$ , respectively, with associated high production of nitric oxide (LEZAMA-DÁVILA et al., 2012). One study evaluated the leishmanicidal use of a new naphthoquinone derivative, Flau-A [2-(2,3,4-tri-O-acetyl-6-deoxy- $\beta$ -L-galactopyranosyloxy)-1,4-naphthoquinone], against forms promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis* and *L. chagasi*. The authors observed that the compound was active for both species through mechanisms that involved loss of mitochondrial membrane potential, as well as increased production of reactive oxygen species, cell shrinkage, and alteration of plasma membrane integrity (MENDONÇA, et al., 2018).

The 1,4-naphthoquinone derivatives that were analyzed here were intended as trypanosomatid cysteine protease inhibitors. Cysteine protease is an enzyme that plays a crucial role in parasite survival, as it interferes with parasite virulence, maintenance of parasite viability and morphology, invasion of the host's mononuclear phagocytic system, and modulation of the immune response (SUNDAR; SINGH, 2018; SILVA et al., 2021). Other naphthoquinone derivatives were synthesized and also indicated as potent cysteine protease inhibitors, inhibiting rhosaine, an essential protease of a human pathogenic parasite, with subnanomolar affinity (KLEIN et al., 2020).

The three derivatives tested here showed activity against the promastigotes forms of both *L. chagasi* and *L. amazonensis*, with emphasis on the derivative JN22 which proved to be the most potent of the evaluated compounds, with superior selectivity to the standard drug and without showing cytotoxic effect to macrophages. These features support ongoing research into the leishmanicidal activity of this series of 1,4-naphthoquinone derivatives.

## 5. Conclusions

The results presented here from the cytotoxicity assay provide important information

for the screening of molecules with the potential to become leishmanicidal drugs. Treatment with the 1,4-naphthoquinone derivatives tested here showed potent leishmanicidal activity against *L. chagasi* and *L. amazonensis* parasites. With emphasis on the compound JN22, which in addition to being active against both species, with selectivity equal to or greater than amphotericin B and without cytotoxicity to the host cell. These data show the derivatives as promising substances for the design of new prototypes of antileishmania drugs.

## References

- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.
- BABULA, Petr et al. Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones-their occurrence, pharmacological properties and analysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 1, p. 47-68, 2009.
- BASTOS, M. M. et al. Antileishmanial Chemotherapy: A Literature Review. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016.
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235-242, 2015.
- DE ARAUJO, Morgana V. et al. Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N, N'-dialkylamino-1, 4-naphthoquinone derivatives. **Experimental Parasitology**, v. 176, p. 46-51, 2017.
- DE MUYLDER, G. et al. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, p. e1253, 2011.
- DE SENA PEREIRA, Valeska Santana et al. Cytotoxicity, hemolysis and in vivo acute toxicity of 2-hydroxy-3-anilino-1, 4-naphthoquinone derivatives. **Toxicology reports**, v. 3, p. 756-762, 2016.
- EHRHARDT, Katharina et al. The antimalarial activities of methylene blue and the 1, 4-naphthoquinone 3-[4-(trifluoromethyl) benzyl]-menadione are not due to inhibition of the mitochondrial electron transport chain. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2114-2120, 2013.
- ELLENDORFF, Therese et al. PLS-Prediction and confirmation of hydrojuglone glucoside as the antitrypanosomal constituent of *Juglans* spp. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 10082-10094, 2015.

- KISHORE, Navneet et al. Cytotoxicity of synthesized 1, 4-naphthoquinone analogues on selected human cancer cell lines. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 17, p. 5013-5019, 2014.
- KLEIN, Philipp et al. Naphthoquinones as covalent reversible inhibitors of cysteine proteases—studies on inhibition mechanism and kinetics. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2064, 2020.
- KUMAGAI, Yoshito et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 52, 2012.
- LEZAMA-DÁVILA, Claudio Manuel et al. Leishmanicidal activity of two naphthoquinones against *Leishmania donovani*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 10, p. 1761-1764, 2012.
- MENDONÇA, Débora VC et al. Flau-A, a naphthoquinone derivative, is a promising therapeutic candidate against visceral leishmaniasis: A preliminary study. **Experimental Parasitology**, v. 233, p. 108205, 2022.
- MENDONÇA, Débora Vasconcelos Costa et al. Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivative against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. **Parasitology research**, v. 117, n. 2, p. 391-403, 2018.
- OPAS - Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington: OPAS, 2019. 166 p.
- ORTIZ-PÉREZ, Eyra et al. Natural and synthetic naphthoquinones as potential anti-infective agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 2046-2069, 2021.
- PINTO, Erika G. et al. Potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1, 4]-naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: biological activity and structure-activity relationships. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105127, 2014.
- Qiu, H. Y., Wang, P. F., Lin, H. Y., Tang, C. Y., Zhu, H. L., & Yang, Y. H. (2018). Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. **Chemical biology & drug design**, 91(3), 681-690.
- ROCHA, Marcele Neves et al. Cytotoxicity and in vitro antileishmanial activity of antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) complexes of lapachol. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2013, 2013.
- SILVA, Leandro Rocha et al. Computer-aided design of 1, 4-naphthoquinone-based inhibitors targeting cruzain and rhodesain cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 116213, 2021.
- STEBUT, E. V. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**. p. 191-202, 2015.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Available in:  
<<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Accessed on: June 05, 2022.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discov Today**. v. 0(0). 2017.

## 6 CONCLUSÕES

- O estudo da literatura, por meio da prospecção tecnológica indicou os avanços obtidos nos últimos 10 anos no campo de diagnóstico imunológico da leishmaniose cutânea, evidenciando o Brasil como o país predominante no depósito de patentes. A produção de kits de imunodiagnóstico utilizando novos peptídeos ou novas proteínas isoladas dos parasitos foi o método mais comumente observado nas patentes, utilizando técnicas sorológicas já conhecidas, como ELISA e citometria de fluxo. As patentes avaliadas trazem dados preliminares e teve seu número de depósitos diminuído nos últimos três anos, em função da pandemia causada pelo coronavírus. Isso fortalece ainda mais a necessidade de desenvolver um método imunodiagnóstico inovador para a leishmaniose cutânea.
- O estudo acerca do desenvolvimento de um novo método imunodiagnóstico usando técnicas acustofluídicas demonstrou a capacidade de aprisionamento de antígenos *de L. amazonenses* no dispositivo acustofluídico, de forma rápida, fácil e utilizando um baixo volume de amostra. O padrão de imagem entre amostras negativas e positivas é muito semelhante e revela uma limitação que a técnica possui em fazer esta diferenciação, já que o dispositivo aglomerou os antígenos em todas as amostras.
- Com relação à avaliação farmacológica da série de derivado de 1,4-naftoquinona, os resultados aqui demonstrados indicaram que o tratamento com os derivados mostrou potente atividade leishmanicida contra os parasitos de *L. chagasi* e *L. amazonensis*. Com destaque para o composto JN22, que além de ser ativo contra ambas as espécies, com seletividade equivalente ou superior à anfotericina B, sem apresentar citotoxicidade para a célula hospedeira.



## REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, B. et al. Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. **Experimental parasitology**, v. 133, n. 3, p. 307-313, 2013.
- AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALMEIDA, A. F. et al. Avaliação da produção de citocinas Th17, Th1 e Th2 por linfócitos T em pacientes com leishmaniose tegumentar americana. 2013. 83 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
- ALVES, F. et al. Recent development of visceral leishmaniasis treatments: successes, pitfalls, and perspectives. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. e00048-18, 2018.
- ARAMAYO, L. V. et al. Leishmaniasis tegumentaria y flebotomos en la localidad de Colonia Santa Rosa del norte de Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, 2021.
- ASAD, M.; BHATTACHARYA, P.; BANERJEE, A.; ALI, N. Therapeutic and immunomodulatory activities of short-course treatment of murine visceral leishmaniasis with KALSOME10, a new liposomal amphotericin B. **BMC Infect Dis.**, v. 15, p. 188, 2015.
- BAĞCI, Ö. U. Impact of the COVID-19 Duration on Neglected Parasitic Diseases. **Turkiye parazitolojii dergisi**, v. 45, n. 4, p. 317-325, 2021.
- BARANI, A. et al. Microfluidic integrated acoustic waving for manipulation of cells and molecules. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 714-725, 2016.
- BEZERRA, G. S. N. et al. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Leishmania infantum* strain from Brazil. **Iranian journal of parasitology**, v. 15, n. 1, p. 155, 2020.
- BLACKWELL, J. M. et al. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 1, n. 162, p. 324-331, 1985.
- BRAHMACHARI, Upendranath et al. A Treatise on Kala Azar. A Treatise on Kala Azar., 1928.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasil, Brasília, DF, 2014, 120 p.
- BRUNTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13**. Artmed Editora, 2018.

- BURZA, S.; CROFT, S.L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 92, n. 10151, p. 951-970, 2018.
- CARFAGNA, I. E. et al. Involvement of lipids from *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes in macrophage activation. **Molecular Immunology**, v. 125, p. 104-114, 2020.
- CASULLI, A. New global targets for NTDs in the WHO roadmap 2021–2030. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. e0009373, 2021.
- CECCARELLI, M. et al. Exploiting genetic polymorphisms in metabolic enzymes for rapid screening of *Leishmania infantum* genotypes. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2018.
- CHEN, Y. et al. High-throughput acoustic separation of platelets from whole blood. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 18, p. 3466-3472, 2016.
- COSTA, L.E.; SALLES, B.C.; ALVES, P.T. et al., New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **J. Immunol. Methods**, v. 434, p. 39–45, 2016.
- COSTA-MADEIRA, J. C. et al. T Lymphocyte Exhaustion During Human and Experimental Visceral Leishmaniasis. **Front. Immunol.** 13: 835711. doi: 10.3389/fimmu, 2022.
- COTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.
- COURTENAY, O. et al. Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 10, p. e1006571, 2017.
- CROFT, Simon L.; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.
- DE SOUZA, H. P. et al. Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil de 2010 a 2017: aspectos para vigilância em saúde. **Revista panamericana de salud publica**, v. 44, p. e10, 2020.
- DING, X. et al. Surface acoustic wave microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 18, p. 3626-3649, 2013.
- DO NASCIMENTO, Jessica Juliana do; CARVALHO, Priscilla Layanna Bezerra de; ROCHA, Francisca Janaina Soares. Diagnóstico histopatológico diferencial entre hanseníase e leishmaniose tegumentar americana em pacientes de um hospital público em Recife-PE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas [Internet]**, v. 51, n. 2, p. 127-31, 2019.
- DORLO, T. P. C. et al. Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 1, p. 146-153, 2014.

DOS SANTOS MEIRA, C.; GEDAMU, L. Protective or detrimental? understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 695, 2019.

EFSTATHIOU, A.; SMIRLIS, D. Leishmania protein kinases: important regulators of the parasite life cycle and molecular targets for treating leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 691, 2021.

ELLENDORFF, T. et al. PLS-Prediction and confirmation of hydrojuglone glucoside as the antitrypanosomal constituent of *Juglans* spp. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 10082-10094, 2015.

ENGELS, D.; ZHOU, X. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious diseases of poverty**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2020.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Phlebotomine sand flies - Factsheet for experts**. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies>.

FERREIRA, E. P. R. **Planejamento e avaliação in sílica de análogos de lapachol em enzima alvo de Leishmania (Leishmania) amazonensis**. 2017. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

FERREIRA, T. N. et al. Effects of anti-Leishmania compounds in the behavior of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Pest Management Science**, 2022.

FRANCISCO FERREIRA, V. et al. Strategies for increasing the solubility and bioavailability of anticancer compounds:  $\beta$ -lapachone and other naphthoquinones. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 39, p. 5899-5914, 2016.

FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

G DE PAIVA, Y. et al. Electrochemically driven supramolecular interaction of quinones and ferrocifens: an example of redox activation of bioactive compounds. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 2, p. 136-162, 2015.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 89, n. 5, p. 701- 711, 2014.

GRANATO, J. T. **Efeito antileishmanial de derivados esteroidais em Leishmania sp**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. 2018.

HAMILTON, P. T. et al. Infection dynamics and immune response in a newly described *Drosophila*-trypanosomatid association. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e01356-15, 2015.

HASHIGUCHI, Y. et al. Leishmaniasis in Ecuador: comprehensive review and current status. **Acta tropica**, v. 166, p. 299-315, 2017.

HEYRIES, K. A. et al. Megapixel digital PCR. **Nature methods**, v. 8, n. 8, p. 649-651, 2011. [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_3](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_3)

JADHAV, S. A. et al. Development of integrated microfluidic platform coupled with Surface-enhanced Raman Spectroscopy for diagnosis of COVID-19. **Medical Hypotheses**, v. 146, p. 110356, 2021.

JARA, M. et al. Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage. **PLoS one**, v. 12, n. 7, p. e0180532, 2017.

JAWED, J. J.; DUTTA, Sayanika; MAJUMDAR, Subrata. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 117, p. 109098, 2019.

JIMÉNEZ, A. V. et al. Acoustophoretic Motion of *Leishmania* spp. Parasites. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 48, n. 7, p. 1202-1214, 2022.

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

KUMAGAI, Y. et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 52, 2012.

KUMAR, Rajiv et al. Type I interferons suppress anti-parasitic immunity and can be targeted to improve treatment of visceral leishmaniasis. **Cell reports**, v. 30, n. 8, p. 2512-2525. e9, 2020.

KUMARI, D. et al. Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics: An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 910, p. 174436, 2021.

LAISON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-DENDRICK, R. (Ed.) **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987, p. 1-20, 1987.

LAUTHIER, J. J. et al. Development of a Multilocus sequence typing (MLST) scheme for Pan-*Leishmania*. **Acta Tropica**, v. 201, p. 105189, 2020.

LI, P.; HUANG, T. J. Applications of acoustofluidics in bioanalytical chemistry. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 1, p. 757-767, 2018.

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, p. 1197–1206, 2017.

MAGALHÃES, S. C. M.; DE MOURA, K. V. R. A expansão da leishmaniose tegumentar americana no município de Montes Claros - Minas Gerais. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, Minas Gerais, v. 21, n. 11, p. 80 - 92, dez. 2015.

MARTINS, Beatriz R. et al. Development of an electrochemical immunosensor for specific detection of visceral leishmaniasis using gold-modified screen-printed carbon electrodes. **Biosensors**, v. 10, n. 8, p. 81, 2020.

MAURELLI, M. P.; BOSCO, A.; MANZILLO, V. F. et al. Clinical, Molecular and Serological Diagnosis of Canine Leishmaniosis: An Integrated Approach. **Veterinary Sciences**, v. 7, p. 43, 2020.

MERRITT, C. et al. Kinases as druggable targets in trypanosomatid protozoan parasites. **Chemical reviews**, v. 114, n. 22, p. 11280-11304, 2014.

MIGUEL, D. C. et al. The impact of COVID-19 on neglected parasitic diseases: what to expect?. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 8, p. 694-697, 2021.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 2, n. 3, p. 36, 2017.

MONTEIRO, F. M.; MACHADO, A. S.; ROCHA-SILVA, F. et al. Canine visceral leishmaniasis: detection of *Leishmania* spp. genome in peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 263–268, 2018.

MORAES, C. S. et al. Second blood meal by female *Lutzomyia longipalpis*: enhancement by oviposition and its effects on digestion, longevity, and *Leishmania* infection. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

MUKHTAR, M. et al. Diagnostic accuracy of rK28-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis: a prospective clinical cohort study in Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, p. 594–600, 2015.

MUXEL, S. M. et al. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2682, 2018.

NICULESCU, A. G. et al. Fabrication and applications of microfluidic devices: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 2011, 2021.

OLIVEIRA, L. F. G. et al. Antileishmanial activity of 2-methoxy-4H-spiro-[naphthalene-1, 2'-oxiran]-4-one (Epoxymethoxy-lawsone): a promising new drug candidate for leishmaniasis treatment. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 864, 2018.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Nono relatório do Grupo Consultivo Estratégico e Técnico para Doenças Tropicais Negligenciadas (STAG-DTNs)** (2021). Disponível em: [https://www.who.int/publications/m/item/ninth-report-of-the-strategic-and-technical-advisory-group-for-neglected-tropical-diseases-\(stag-ntds\)](https://www.who.int/publications/m/item/ninth-report-of-the-strategic-and-technical-advisory-group-for-neglected-tropical-diseases-(stag-ntds)) ). Acesso em: 27 de março de 2022.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington: OPAS/OMS, 2019. Disponível em:

[www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis). Acesso em: 22 mai. 2022.

OPAS, Organización Panamericana De La Salud. Departamento de Enfermedades Transmisibles y Análisis de Salud. **Plan de Acción Para Fortalecer la Vigilancia y Control de las Leishmaniasis en Las Américas 2017-2022**. Washington D.C.: OPAS, 2017. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34144>. Acesso em: 5 jun. 2022.

OPAS, Organización Panamericana De La Salud. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPS, 2019a. Disponível em: [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50524/9789275320631\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 02 mai. 2022.

OPAS, Organización Panamericana De La Salud. **Programa de Control de Leishmaniasis Normas, pautas y procedimientos para el diagnóstico y control**. Caracas: Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2019b. Disponível em: 143 [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51880/9789806678095\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51880/9789806678095_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 04 jun. 2022.

PEDRAL-SAMPAIO, G. et al. Detection of IgG anti-Leishmania antigen by flow cytometry as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162793, 2016.

PIMENTA, P. F et al. Biology of the 72 Leishmania – Sand Fly Interaction. In: EF Rangel, JJ Shaw (Org.). **Brazilian Sand Flies**. 1. ed.: Springer International Publishing, 2018: 319-339.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.

PRADA, Y. A. et al. Design and characterization of high-affinity synthetic peptides as bioreceptors for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 413, n. 17, p. 4545-4555, 2021.

RAI, R. et al. Apoptotic induction induces Leishmania aethiopica and L. mexicana spreading in terminally differentiated THP-1 cells. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1912-1921, 2017.

REBOUÇAS, A. et al. Leishmania-Induced Dendritic Cell Migration and Its Potential Contribution to Parasite Dissemination. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1268, 2021.

REIMÃO, J. Q. et al. Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: current and future methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, 2020.

ROCHA, M. N. et al. Cytotoxicity and in vitro antileishmanial activity of antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) complexes of lapachol. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2013, 2013.

RODRIGO, C. et al. Amphotericin B for treatment of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of prospective comparative clinical studies including dose-ranging studies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 591-598, 2018.

ROGERS, M. E. et al. Leishmania infantum proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, Lutzomyia longipalpis, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 11, p. 875-879, 2010.

ROGERS, M. J. et al. Membrane Technology for Rapid Point-of-Care Diagnostics for Parasitic Neglected Tropical Diseases. **Clinical microbiology reviews**, v. 34, n. 4, p. e00329-20, 2021.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!. *International Immunology*, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2017. SACKS D, SHER A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**. v. 3, n. 11, p. 1041-1047, 2002.

SALAS, C. et al. Trypanosoma cruzi: activities of lapachol and  $\alpha$ - and  $\beta$ -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 2, p. 668-674, 2008.

SANZ, C. R. et al. Modulation of Host Immune Response during Leishmania infantum Natural Infection: A Whole-Transcriptome Analysis of the Popliteal Lymph Nodes in Dogs. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

SCHELER, O.; POSTEK, W.; GARSTECKI, P. Recent developments of microfluidics as a tool for biotechnology and microbiology. **Current opinion in biotechnology**, v. 55, p. 60-67, 2019.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SILVA, L. R. et al. Computer-aided design of 1, 4-naphthoquinone-based inhibitors targeting cruzain and rhodesain cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 116213, 2021.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. de. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, p. 486-495, 2016.

SOUZA-FILHO, J.A.; BARBOSA, J.R.; FIGUEIREDO, F.B. et al. Performance of Alere<sup>TM</sup> immunochromatographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p.114–116, 2016.

SRIWORARAT, C. et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of Leishmania infection. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2015.

STONE, N. R. H. et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome<sup>®</sup>): a review of the

pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. **Drugs**, v. 76, n. 4, p. 485-500, 2016.

SUNDAR, S. et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012.

SUNDAR, S.; SINGH, B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 22, n. 6, p. 467-486, 2018.

TEIXEIRA, D. E. et al. The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TEIXEIRA, L. P. Prospecção tecnológica: importância, métodos e experiências da Embrapa Cerrados. 2013. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100348/1/doc-317.pdf>

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 19-25, 2020.

TOMIOTTO-PELLISSIER, Fernanda et al. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2529, 2018.

TRAJANO-SILVA, L. A. M et al. The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, 2017.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

ULIANA, S. R. B; TRINCONI, Cristiana T.; COELHO, Adriano C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, 2018.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 79-99, 2019.

VIANNA, G. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, v. 4, p. 426-8, 1912.

VON PHILIPSBORN, P. et al. Poverty-related and neglected diseases—an economic and epidemiological analysis of poverty relatedness and neglect in research and development. **Global health action**, v. 8, n. 1, p. 25818, 2015.

WELD, E. D. et al. Twice neglected? Neglected diseases in neglected populations. **British journal of clinical pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 367-373, 2022.

WENG, H.; CHEN, H.; WANG, M. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious diseases of poverty**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018.

WHO, World Health Organization (2022). **Leishmaniasis**. Disponível em [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/). Acesso: 05 Mar. 2022.



WHO, World Health Organization (2010). **Control of the leishmaniases**. World Health Organization Technical Report Series, n. 949, p. 21, 2010.

WHO, World Health Organization (2020). **Neglected tropical diseases: impact of COVID-19 and WHO's response**. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334557>. *Wkly Epidemiol Rec. No 39 2020*;95: 461–476.

WIKLUND, M.; RADEL, S.; HAWKES, J.J. Acoustofluidics 21: ultrasoundenhanced immunoassays and particle sensors. **Lab Chip**, v. 13, p. 25-39, 2013.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. **Infection and immunity**, v. 56, n. 2, p. 363-369, 1988.