Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES: DA PROTEÇÃO INTELECTUAL À DISPONIBILIDADE COMERCIAL

por

Eduardo Ribeiro de Oliveira

Belo Horizonte

2016

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR E.R. OLIVEIRA 2016

EDUARDO RIBEIRO DE OLIVEIRA

ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES: DA PROTEÇÃO INTELECTUAL À DISPONIBILIDADE COMERCIAL

por

Eduardo Ribeiro de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Ana Rabello
Coorientação: Dra. Tália Machado de Assis

Belo Horizonte
2016

Catalogação-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

O48a Oliveira, Eduardo Ribeiro de.
2016

Análise do desenvolvimento tecnológico para o diagnóstico das leishmanioses: da proteção intelectual à disponibilidade comercial / Eduardo Ribeiro de Oliveira. – Belo Horizonte, 2016.

xvii, 134 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 127 - 151

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose/diagnóstico 2. *Leishmania*/parasitologia 3. Desenvolvimento Tecnológico/políticas I. Título. II. Rabello, Ana (Orientação). III. Assis, Tália Machado de (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

EDUARDO RIBEIRO DE OLIVEIRA

ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES: DA PROTEÇÃO INTELECTUAL À DISPONIBILIDADE COMERCIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Banca Examinadora:
Prof. Dra. Ana Lúcia Teles Rabello (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente
Prof. Dr. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (CPqRR/FIOCRUZ) Titular
Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal (UFMG) Titular
Prof. Dr. Gláucia Cota Fernandes (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 29/08/2016

Mãe, seu cuidado e dedicação que deram, em todos os momentos, a esperança para seguir.

Pai, sua presença e apoio significaram segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

Meu irmão, César, sua confiança e companheirismo são fontes de segurança para buscar novos sonhos.

A vocês, pessoas que fundamentam as razões de minha existência, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser luz e força no meu caminho.

À minha orientadora, Dr. Ana Rabello, pela oportunidade, atenção, paciência e competência ao transmitir seus conhecimentos. A concretização deste sonho tornou-se possível por que você aceitou conduzir o meu desafio.

À minha coorientadora, Dr. Tália S. Machado de Assis, que não mediu esforços para me conduzir passo a passo com seu imenso conhecimento, acreditando e, sobretudo fazendo-me acreditar que era possível a realização e conclusão do meu mestrado.

À agência de fomento CAPES, pela bolsa de estudos concedida para a realização do meu mestrado.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnicocientífica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos colaboradores do NIT pelas preciosas contribuições para este trabalho. Em especial, à Cristina Carrara pela competência, disposição e delicadeza em tantas colaborações. À Mayara Melo, que contribuiu com seus conhecimentos na construção deste objetivo e compartilhou os mais diversos momentos nas disciplinas cursadas.

Ao Dr. Daniel e Dr. Edward, por serem tão prestativos e partilharem seus conhecimentos.

A todos os amigos do grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, pelas inúmeras colaborações e por tantos momentos compartilhados durante minha trajetória. Gostaria de nomeá-los cada um, mas felizmente são tantos que as palavras se tornam insuficientes para demonstrar tamanho carinho.

Aos amigos do LESQ, pela amizade e torcida. Em especial, um extenso e carinhoso agradecimento à Diana Taboada, Rafaella Fortini e Liliane, que me acompanham desde o início da minha carreira científica.

Às secretarias Andrea, Fernanda e Jussara, pela gentileza e atenção.

Ao Charles pela colaboração e conhecimentos compartilhados.

Aos grandes amigos que conquistei durante as disciplinas, confraternizações e nos momentos vividos no CPqRR: Carolina Senra, Nayara Castelano, Vanessa Moraes, Líndicy Alves, Nathalie Bonatti, Diana, Mariana Freire, Dian, Verônica e Erica, que com carinho e muita compreensão ao longo do mestrado, me apoiaram e me fizeram acreditar que era possível concluir.

Aos amigos de moradia e a Lídia por me compreenderem nas mais diversas manifestações do meu humor. Em especial, ao Bruno que, com tanta sensatez e sabedoria me ajudava a retomar o equilíbrio e prosseguir.

À Karla pelo incentivo de sempre.

Aos amigos mais que especiais que sempre torceram para que eu alcançasse a defesa e por me ensinarem a ter perseverança (Amigos de Bonfim, Filipe V., Mariana M., Leandro C., Weliton, Luiz Otávio, Rodrigo).

A todos os familiares, sempre queridos, pela torcida, carinho e preces.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) estão na lista de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) da Organização Mundial da Saúde e da Organização Pan-Americana da Saúde. Para acelerar a superação do impacto das DTNs sobre as populações acometidas, as ações identificadas como necessárias são intensificação do diagnóstico e do manejo clínico. O investimento em pesquisa e desenvolvimento para necessidades das DTNs é pequeno, quando comparado a doenças ou condições com potencial de retorno financeiro para a indústria e para os serviços. O objetivo deste trabalho foi analisar o cenário do desenvolvimento tecnológico relacionado ao diagnóstico das leishmanioses, disponível em base patentária e artigos científicos. A busca sistematizada em bancos de depósitos de patentes (Thomson Innovation®) e base de dados de produção científica (PubMed – U. S. National Library of Medicine) compreendeu o período de 01/01/2003 a 01/06/2015. O conteúdo das patentes foi analisado quanto a utilidade, foco tecnológico, aplicação e tipo de proteção requerida. Na produção científica, considerou-se novas metodologias de diagnóstico para as leishmanioses aquelas que não estão em comercialização no Brasil e uso rotineiro ou que apresentavam melhorias sobre as utilizadas. A busca por patentes resgatou 787 documentos, destes 19 (2,4%) apresentavam prova de conceito para diagnóstico das leishmanioses, sendo duas nacionais, depositadas pela Fiocruz. A pesquisa em literatura científica para o diagnóstico da LT resultou em 1.538 artigos, dos quais 16 artigos foram analisados detalhadamente, após seleção pela leitura dos resumos. Para o diagnóstico da LV, a busca resultou em 4.126 artigos e 14 foram selecionados para análise. Em conjunto, 30 novos métodos/testes foram analisados. Entre os 5 métodos/testes relacionados ao diagnóstico parasitológico, predominam novas técnicas de cultivo de parasito e não há nenhum produto comercializado. Entre os 3 métodos/testes voltados à pesquisa de antígeno, destaca-se um kit comercial desenvolvido nos Estados Unidos e não avaliado no Brasil, para identificação de um antígeno específico em fragmentos de lesão cutânea. Entre os 16 métodos/testes baseados em pesquisa de anticorpos específicos destacam-se os testes rápidos com novos antígenos recombinantes, sendo o mais avaliado o antígeno recombinante rK39, que tem dois kits comerciais registrados no Brasil, sendo um atualmente distribuído pelo SUS aos laboratórios e serviços de referência do país. Cinco métodos/testes moleculares se destacam com melhor desempenho, sendo que os métodos de amplificação isotérmica com leitura visual oferecem perspectiva de uso em locais remotos. Duas oportunidades para autossuficiência de produção nacional de testes de elevado desempenho e aumento de acesso a diagnóstico foram identificadas: a produção de antígeno rK39, cuja patente expirou e o teste de aglutinação direta – DAT, que tem protótipo nacional validado. O estudo confirma o baixo investimento do setor industrial no desenvolvimento de testes para o diagnóstico das leishmanioses e explicita a necessidade de parcerias entre instituições tecnológicas, universidades e indústria, dirigidas às necessidades de saúde pública do país, com ação coordenada dos órgãos públicos.

Palavras-chave: Leishmanioses, diagnóstico, *Leishmania,* patentes, inovação tecnológica

ABSTRACT

Tegumentary leishmaniasis (LT) and visceral leishmaniasis (LV) are on the list of neglected tropical diseases (NTDs) of the World Health Organization and the Pan American Health Organization. To accelerate the overcoming of the impact of NTDs on affected populations actions identified as necessary are to intensify diagnosis and clinical management. Investment in research and development for know-how of NTDs is low when compared to diseases or conditions with potential financial returns for industry and services. The objective of this research was to analyze the technological development scenario related to the diagnosis of leishmaniasis, available on patent data basis and scientific publications. The systematized search in patent databanks (Thomson Innovation®) and scientific publications (PubMed - U. S. National Library of Medicine) comprised the period from 01/01/2003 to 06/01/2015. The content of the patents was analyzed as to the utility, technological focus, application and type of protection required. In scientific production, new diagnostic methodologies for leishmaniasis were considered those that are not commercialized in Brazil and routinely used or that showed improvements over those already used. The search for patents rescued 787 documents from those 19 (2.4%) was offered the concept for the diagnosis of leishmaniasis, two of which were deposited by Fiocruz. The research in scientific literature for the diagnosis of LT resulted in 1,538 articles, of which 16 articles were analyzed in detail, after selection by abstracts reading. For the diagnosis of VL, the search resulted in 4,126 articles and 14 were selected for analysis. Together, 30 new methods/tests were analyzed. Among the 5 methods/tests related to parasitological diagnosis, new parasite cultivation techniques predominate and there are no commercialized products. Among the 3 methods/tests directed to antigen research, a commercial kit, developed in the United States and not evaluated in Brazil, to identify a specific antigen in cutaneous lesion fragments stands out. Among the 16 methods/tests based on specific antibodies research, there are the rapid tests with new recombinant antigens, the most evaluated being the recombinant antigen rK39, which has two commercial kits registered in Brazil, one currently distributed by SUS to laboratories and Services of the country. The 5 molecular methods/tests stand out with better performance, whereas isothermal amplification methods with visual reading offer perspective of use in remote places. Two opportunities for self-sufficiency in national production of high performance tests and increased access to diagnosis were identified: the production of antigen rK39, whose patent has expired and the direct agglutination test - DAT, which has a validated national test. The study confirms the low investment of the industrial sector in the development of tests for the diagnosis of leishmaniasis and explains the need for enterprises between research institutions, universities and industry, directed to the public health needs of the country, with coordinated action of public agencies.

Key words: Leishmaniasis, diagnosis, *Leishmania*, patents, technological innovation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratificação por presença ou ausência de prova de conceito para as leishmanioses nas 787 patentes resgatadas na base de dados Thomson Innovation®, entre 01/01/2003 e 01/06/2015. 61

Figura 2. Número anual de depósitos prioritários com prova de conceito das patentes relacionadas ao diagnóstico das leishmanioses, pesquisadas na base de dados Thomson Innovation®, entre 01/01/2003 e 01/06/2015..... 62

Figura 3. Categoria dos depositantes das 19 patentes relacionadas ao diagnóstico das leishmanioses, com prova de conceito, pesquisadas na base de dados Thomson Innovation® entre 01/01/2003 e 01/06/2015. 62

Figura 4. Distribuição dos 19 depósitos patentários com prova de conceito, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, por agências e países, de 01/01/2003 à 01/06/2015. 63

Figura 5. País de origem dos depositantes dos 19 depósitos patentários com prova de conceito, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, entre 01/01/2003 e 01/06/2015. 64

Figura 6. Estratificação das 19 patentes com prova de conceito para leishmanioses, durante o período compreendido entre 01/01/2003 e 01/06/2015, de acordo com o método diagnóstico. 65

Figura 7. Número e ano de publicação dos artigos incluídos na análise descritiva, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, pesquisados na base de dados PubMed – U. S. National Library of Medicine, entre 01/01/2003 e 01/06/2015..... 69

Figura 8. Estratificação dos artigos avaliando técnicas de diagnósticos para leishmanioses, durante o período compreendido entre 01/01/2003 e 01/06/2015. 70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Códigos da Classificão Internacional de Patentes utilizados na busca de documentos relacionados ao diagnóstico e tratamento das leishmanioses, na base de dados Thomson Innovation®, entre 2003 e 2015. 54
Quadro 2. Variáveis pesquisadas nos documentos de patentes e que compuseram o banco de dados. 55
Quadro 3. Lista de países e seus códigos de acordo com a base de dados internacional Thomson Innovation®. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das instituições depositantes e número de depósitos, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, entre 01/01/2003 e 01/06/2015. 64
Tabela 2 Identificação, informações bibliográficas e status dos 19 depósitos com prova de conceito, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, entre 01/01/2003 e 01/06/2015. 66
Tabela 3. Estudos selecionados para análise do diagnóstico das leishmanioses, em bases de divulgação científica identificados de 2003 a 2015..... 71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANPPS - Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEIS - Complexo Econômico Industrial da Saúde

CF - Citometria de Fluxo

CIP - Classificação Internacional de Patentes

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisas

CPPI - Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos

CPqRR- Centro de Pesquisas René Rachou

C,T&I - Ciência, Tecnologia e Inovação

C&T - Ciência e Tecnologia

DAT - Direct Agglutination Test (Teste de Aglutinação Direta)

DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DNDi - Drugs for Neglected Diseases initiative

DPP - Dual Parth Platform (Plataforma Duplo Percurso)

DTH - Delayed-Type Hypersensitivity (Resposta de Hipersensibilidade Tardia)

DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas

ELISA - Ensaio imunoenzimático

EM - Espectrometria de Massa

EMPRABII - Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial

EPO - European Patent Office

FINEP - Financiamento de Estudos e Projetos

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FISH - Fluorescence *In Situ* Hybridization

HIV - Vírus Da Imunodeficiência Humana

ICT - Instituição Científica e Tecnológica

IDRM - Intradermorreação de Montenegro

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

ITS1- Espaçador Interno Transcrito 1 (ITS1)

LAMP - Loop-Mediated Isothermal Amplification

LAT - Latex Agglutination Test (Teste de Aglutinação em Látex)

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada

LM - Leishmaniose Mucosa

LMC - Leishmaniose Muco-Cutânea

LT - Leishmaniose Tegumentar

LTA -Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose Visceral

MCM - Method of Microcapillary Culture (Método de Cultura Microcapilar)

MCT - Ministério da Ciência e Tecnologia

MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

MS - Ministério da Saúde

NASBA - Nucleic Acid Sequence Based Amplification

NIT - Núcleo de Inovação Tecnológica

OCDE – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMPI - Organização Mundial da Propriedade Intelectual

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

pb - Pares de Base

PBM - Plano Brasil Maior

PCPPDIP - Pesquisas Clínicas e Políticas Públicas de Doenças Infecciosas e Parasitárias

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PCT - Tratado de Cooperação em Patentes

PDP - Política de Desenvolvimento Produtivo

P&D - Pesquisa e Desenvolvimento

PKDL - Leishmaniose dérmica pós-kala-azar

PNCTIS - Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde

PNI - Programa Nacional de Apoio às Incubadoras de Empresas e Parques Tecnológicos

PITCE - Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior

qPCR - real-time PCR (PCR em tempo real)

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

rK39 - Antígeno recombinante K39

RNA – ácido ribonucleico

SCTIE - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos

SELDI - Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNI - Sistema Nacional de Inovação

SISLAB - Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública

SLA - Soluble Antigen of *Leishmania* (Antígeno Solúvel de *Leishmania*)

SUS - Sistema Único de Saúde

TCM - Traditional Culture Method (Método de Cultura Tradicional)

TRIPS - Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights (Acordo sobre os Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio)

TSA - Tiol Specific Antigen

WB - Western Blotting

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
2 REFERENCIAL TEÓRICO 22
2.1 Doenças tropicais negligenciadas 22
2.2 As leishmanioses 23
2.2.1 Leishmaniose tegumentar 24
2.2.2 Leishmaniose visceral 31
2.3 Políticas Públicas de Ciência, Tecnologia & Inovação 39
2.3.1 Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde 45
2.3.2 Políticas de Inovação 47
2.4 Proteção Intelectual 49
2.5 Prospecção Tecnológica 50
3 OBJETIVOS 52
3.1 Objetivo geral 52
3.2 Objetivos específicos 52
4 MATERIAL E MÉTODOS 53
4.1 Prospecção e análise patentária 53
4.2 Prospecção e análise de novas metodologias diagnósticas para as leishmanioses descritas na literatura 59
4.3 Estudo de caso do antígeno rK39 60
5 RESULTADOS 61
5.1 Caracterização dos depósitos de patentes relacionados ao diagnóstico das leishmanioses 61
5.2 Resultados da prospecção na literatura científica 69
5.3 Descrição dos métodos diagnósticos identificados por busca de depósitos patentários e artigos da literatura científica 75
5.3.1 Diagnóstico parasitológico 75
5.3.2 Métodos baseados em detecção de antígenos 77
5.3.3 Métodos baseados em detecção de anticorpos 81
5.3.4 Proteínas biomarcadoras do hospedeiro 99
5.3.5 Diagnóstico molecular 101
5.4 Estudo de caso do antígeno K39 107
6 DISCUSSÃO 112
6.1 O Panoroma da Proteção Intelectual Relacionada ao Diagnósticos das Leishmanioses 115
6.2 Potencial de Desenvolvimento e Uso dos Métodos Diagnósticos Identificados na Prospecção de Patentes e Literatura 119
7 CONCLUSÕES 126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 127

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas, muitas vezes denominadas, doenças tropicais negligenciadas (DTNs), correspondem a um grupo de doenças infecciosas ou parasitárias que afetam predominantemente as populações mais pobres e vulneráveis dos países em desenvolvimento. Neste contexto, elas contribuem para a perpetuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social (WHO, 2015).

As leishmanioses estão na lista de doenças negligenciadas da OMS e da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Para acelerar a superação do impacto das doenças negligenciadas sobre as populações acometidas, cinco estratégias de saúde são recomendadas pela OMS para a prevenção e controle das DTNs: medicação preventiva - intensificação da gestão de casos, controle de vetores, provimento de água limpa – saneamento, higiene e saúde animal. Estudos sugerem que estas medidas têm melhor resultado quando aplicadas em associação (WHO, 2010). Assim, o controle destas doenças depende de disponibilidade e eficiência de tecnologias em saúde acessíveis aos pacientes.

Dois marcos políticos produzidos nas Assembleias Mundiais da Saúde de 2007 e 2010 resultaram no reconhecimento, pelos países membros, da necessidade de ações coordenadas para o controle das leishmanioses no mundo. O documento de 2007 destaca:

> "Reconhecendo o enorme impacto da doença, a Assembléia Mundial da saúde em 2007 aprovou uma resolução sobre controle da leishmaniose (WHA60.13), estimulando os Estados-Membros nos quais a leishmaniose é um problema da saúde pública substancial para empreender ações e lidar com os principais fatores subjacentes à incapacidade de controlar a doença".
>
> A resolução também solicita ao Diretor-geral da Organização Mundial de Saúde (OMS) para tomar ações em diferentes níveis para reduzir a carga da doença, entre elas:

- promover pesquisas relativas ao controle de leishmaniose, como a busca por de vacinas eficazes e acessíveis, ferramentas de diagnóstico e medicamentos com menos toxicidade e divulgação dos resultados dessa investigação, através do UNICEF/PNUD/Banco Mundial/OMS do programa especial para pesquisa e treinamento em doenças tropicais;
- monitorar o progresso no controle da leishmaniose em colaboração com parceiros internacionais, escritórios regionais da OMS e Estados-Membros afetados pelas leishmanioses;

- promover uma ação com os grandes laboratórios para reduzir os custos de medicamentos para os países em desenvolvimento;
- promover e apoiar estudos avaliando: avaliação da eficácia dos novos medicamentos;
  esquemas posológicos e duração do tratamento para medicamentos existentes;
  padronização de métodos ou testes de diagnóstico, em particular para leishmaniose visceral;
- facilitar a melhoria da coordenação entre as instituições multilaterais e doadores internacionais preocupados com leishmaniose.

Entre os objetivos propostos pela OMS para acelerar a superação do impacto das doenças negligenciadas, para a leishmaniose visceral (LV), apenas a eliminação regional no subcontinente indiano está listada. Em 2010, o documento elaborado por especialistas para o controle da leishmaniose, destaca as ações identificadas como necessárias se referem à intensificação de diagnóstico e manejo clínico, considerados processos-chave para i) diagnóstico precoce, ii) oferta de tratamento para reduzir morbidade e transmissão e iii) manejo das complicações. Especificamente, a OMS recomenda que o diagnóstico precisa ser mais simples e menos invasivo, sem perder sensibilidade, e sustenta a urgente necessidade de reduzir o tempo entre suspeita e diagnóstico para possibilitar tratamento sem atraso.

No Brasil, a LV consta na Portaria Nº 978 do Ministério da Saúde (MS), criada em maio de 2008 e revisada em maio de 2010, que criou o Grupo Executivo do Complexo Industrial da Saúde (GECIS) e dispõe sobre a lista de produtos estratégicos, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2008). Encontra-se a seguinte referência: "Novas biomoléculas e fármacos, por rota biotecnológica, para doenças virais, negligenciadas e neoplasias".

Estudos relacionados à inovação tecnológica voltada para as DTNs, em especial as leishmanioses, são escassos, porém, essenciais para orientar o investimento, estabelecer prioridades e o estabelecimento de políticas públicas efetivas.

Considerando a necessidade de fortalecer a produção pública de métodos diagnósticos e de medicamentos para atender as demandas do SUS, voltadas ao diagnóstico e ao tratamento de DTNs de relevância no país, em 23 de setembro de 2012, o MS, por intermédio da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE) e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), com a parceria da *Drugs for Neglected Diseases*

initiative (DNDi) América Latina, firmaram o Acordo de Cooperação e Assistência Técnica, com o objetivo de implementar um *Programa Colaborativo de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de Novas Alternativas Terapêuticas e de Diagnóstico para Doenças Negligenciadas*, de acordo com as prioridades identificadas e as diretrizes da Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde, promovendo a articulação e a complementaridade das competências dos múltiplos parceiros em diferentes etapas do processo de P&D e fortalecendo ou formando, de maneira sustentável, novas capacidades.

O Termo de Referência do Acordo de Cooperação, define o escopo das DTNs neste Programa:

Entre as 17 doenças consideradas negligenciadas pela OMS, 14 estão presentes no Brasil. O GECIS inclui ainda malária e tuberculose na lista de doenças negligenciadas com necessidade de insumos estratégicos para o SUS. No Brasil, são 14 as doenças para as quais o desenvolvimento tecnológico e/ou o acesso a medicamentos são aspectos causadores de impacto: tracoma, hanseníase, doença de Chagas, leishmaniose visceral (LV), leishmaniose tegumentar (LT), cisticercose, hidatidose, infecções orais por trematódeos (grupo), filariose linfática, oncocercose, esquistossomose e helmintoses intestinais (grupo), malária e tuberculose.

Este acordo inclui a realização de estudos estratégicos relacionados ao diagnóstico e tratamento destas 14 doenças, que analisam contexto epidemiológico, condições de acesso, situação atual de abastecimento de insumos, registros, opções de compra, dependências, riscos, custo, oportunidades de inovação, desenvolvimento e produção nacional, necessidade de acordos e impactos. Estas análises geram recomendações para orientar políticas e investimentos em ciência, tecnologia e inovação.

Os estudos estratégicos foram coordenados pela Fiocruz e desenvolvidos no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) pelo Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

A metodologia e o conteúdo dos estudos foram orientados por um roteiro produzido pela "*Oficina de Definição Metodológica dos Estudos Direcionadores de Desenvolvimento Tecnológico para Diagnóstico e Tratamento de Doenças Negligenciadas*", realizada em julho de 2013, que contou com a participação de técnicos e especialistas da SCTIE, da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), OPAS, Rede de Doenças Negligenciadas do Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), DNDi e FIOCRUZ.

O objeto desta dissertação é parte deste projeto, tendo produzido dados de prospecção de métodos diagnóstico que integram dois Relatórios Técnicos: *Estudos*

Estratégicos para Inovação e Desenvolvimento Tecnológico em Diagnóstico e Terapêutica de Doenças Negligenciadas – 1. Leishmaniose Visceral e 2. Leishmaniose Tegumentar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças tropicais negligenciadas

A OMS define como DTNs um grupo diverso de doenças com características distintas, que se desenvolvem principalmente entre as populações mais pobres (WHO, 2015). Segundo Morel (2006) as doenças negligenciadas são enfermidades geralmente transmissíveis, de elevada ocorrência nos países em desenvolvimento, e, as doenças "mais negligenciadas" são aquelas presentes exclusivamente nos países em desenvolvimento. A maioria das DTNs são doenças antigas, que assolam a humanidade há séculos e em sua maioria, silenciosas, uma vez que os afetados têm pouca visibilidade política (WHO, 2010). O termo doença negligenciada tem sido usado para se referir à negligência da indústria farmacêutica, pelo desinteresse provocado pela limitação de mercado (DNDi, 2014).

Como os indivíduos afetados possuem baixo poder aquisitivo, grande parte vivendo com menos de dois dólares diários, baixa prioridade é dada as DTNs. Segundo a OMS, chama a atenção que a maioria das DTNs possa ser curada com medicamentos que custam entre US$ 0.02–1.50, valores pouco representativos para os países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (CODE), que têm Produto Interno Bruto médio per capita de US$ 28.500, mas que tornam estes medicamentos inacessíveis para as pessoas com renda menor do que US$ 1 por dia e para os governos dos países endêmicos (WHO, 2015).

Crianças, minorias étnicas e mulheres, especialmente aquelas vivendo em áreas remotas, que dificultam o acesso aos serviços de saúde, são considerados grupos de maior risco de infecção por uma DTN (WHO, 2015). Incapacidade, morbidade e mortalidade são indicadores de saúde pública intimamente relacionados com as DTNs. Além destes, percebem-se também efeitos socioeconômicos negativos, afetando educação, agricultura e economia dos países em desenvolvimento. Assim, estas doenças tornam-se um dos principais fatores responsáveis pela manutenção da exclusão social e da condição de subdesenvolvimento dos países onde estão inseridas (KEALEY, 2010).

A lista de DTNs da OMS incluiu dezessete doenças, destas quatorze DTNs estão presentes no Brasil: dengue, raiva, tracoma, hanseníase, doença de Chagas, cisticercose, hidatidose, infecções orais por trematódeos (grupo de doenças), filariose linfática, oncocercose, esquistossomose e helmintoses intestinais (grupo de doenças), LT e LV

(WHO, 2010). As DTNs se concentram nas regiões norte e nordeste do país e há uma relação inversa entre a prevalência destas doenças e o índice de desenvolvimento humano (LINDOSO&LINDOSO, 2009).

2.2 As leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. A transmissão para o homem se dá através da picada de insetos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (LAINSON & SHAW, 1987; KILLICK & RIOUX, 1991). Nas Américas, o gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão das leishmanioses (Young & Duncan,1994; Organização Pan-Americana de Saúde - OPAS, 2015).

Segundo a OPAS (2015), as leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública devido a sua ampla distribuição geográfica e por causarem mortes, incapacidades e mutilações. As leishmanioses são endêmicas em 98 países, com cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção, 12 milhões infectadas e aproximadamente 2 milhões de casos novos por ano (OPAS, 2015; Organização Mundial da Saúde - OMS, 2010). Listadas entre as DNTs, elas estão entre as três doenças com maior peso em termos de anos de vidas perdidos por incapacidade (HOTEZ et al., 2016).

Clinicamente as leishmanioses manifestam-se sob diferentes formas, as quais dependem, principalmente, da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro. As duas formas clínicas básicas que podem se apresentar são: LT e LV (SARAVIA et al., 1989).

Várias espécies do gênero *Leishmania* foram identificadas como agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana (LTA), dentre elas, quatro do subgênero *Leishmania*: *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana*, *Leishmania* (*Leishmania*.) *pifanoi*, *Leishmania* (*Leishmania*) *venezuelensis*, e nove do subgênero *Viannia*: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *colombiensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*, *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* e *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi*. No Brasil, as principais espécies causadoras da LT são a *L. braziliensis*, a *L. amazonensis* e a *L. guyanensis e a* espécie causadora da LV, a *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (LAINSON & SHAW, 1987; LAINSON, 2010).

2.2.1 Leishmaniose tegumentar

A LT é uma doença de evolução crônica, que possui um amplo espectro de manifestações clínicas. Pode se apresentar inaparente ao longo de anos ou evoluir para o surgimento de lesões cutâneas, localizadas geralmente nas áreas mais expostas do corpo. Apresentam diferentes graus de morbidade: desde lesões únicas a formas graves e desfigurantes (BRASIL, 2013). Devido a alta incidência, ampla distribuição geográfica e possibilidade de provocar lesões destrutivas e incapacitantes, interferem no campo psicossocial do indivíduo, com significativo efeito negativo sobre a qualidade de vida dos pacientes (GONTIJO & CARVALHO, 2003; TOLEDO et al., 2013).

No mundo estima-se que 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea (LC) ocorrem anualmente. Aproximadamente um terço dos novos casos ocorre em três principais regiões geográficas: Américas, Mediterrâneo e Ásia (ALVAR et al., 2012). No Brasil, 159.301 casos de LT foram notificados ao Ministério da Saúde entre 2007 e 2013, com média anual de 22.757 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A LT pode ser classificada por suas manifestações clínicas de acordo com a fisiopatogenia, aspecto e localização das lesões, sendo dividida em: LC, leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose muco-cutânea (LMC). As lesões cutâneas podem apresentar-se nas seguintes formas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BRASIL, 2013).

A forma cutânea localizada é a mais frequente no Brasil, caracterizada por lesões únicas ou múltiplas, próximas ao local de inoculação do parasito pelo vetor, que se manifesta com o surgimento de úlcera com formato arredondado ou ovalado, tamanho variado, base infiltrada e bordas bem delimitadas. Esta forma clínica é frequentemente encontrada em homens na terceira a sexta décadas de vida (BRASIL, 2010).

Ainda que observada em no máximo 2% dos casos de LC (COSTA et al., 2009), a forma disseminada ocorre principalmente em homens com mais de quarenta anos de idade, sendo caracterizada pela presença de múltiplas lesões (10-300), principalmente lesões pleomórficas, acneiformes e papulares, em duas ou mais áreas não contíguas do corpo envolvendo com frequência a face e o tronco. Posteriormente, ao desenvolvimento de uma lesão primária, supostamente, ocorre à disseminação do parasito por via hematogênica ou linfática, que se estabelece em poucos dias, às vezes em 24 horas, causando lesões distantes do local da picada (REY, 2001; BRASIL, 2010).

A LM, também conhecida como espúndia, é uma das manifestações de natureza metastática, que acomete principalmente a mucosa nasal e oral. O principal agente etiológico dos casos de LM no Brasil é a *L. braziliensis*. Essa manifestação pode ser secundária à lesão cutânea ou pode também se apresentar anos após a lesão inicial ter sido cicatrizada (BRASIL, 2013). Em países endêmicos, a percentagem de casos de LC com envolvimento das mucosas subsequente é de cerca de 3% a 5%, mas pode ser tão elevado como 20% ou mais (WHO, 2011).

A LMC é mais uma variação clínica da LT e é caracterizada pela presença de lesão na mucosa concomitantemente com lesão cutânea ativa (BRASIL, 2013). As cavidades nasal e oral são preferencialmente afetadas, entretanto lesões ulcerativas podem se estender para a região da orofaringe e traqueia, portanto é uma manifestação clínica debilitante, assim como ocorre na LM e pode levar a problemas psíquicos e estigmatizantes (COSTA et al., 1987; GOIHMAN-YAHR, 1994).

A LCD é uma forma rara, porém grave, sendo caracterizada por formação de placas e múltiplos nódulos não ulcerados, disseminados por todo o corpo do paciente. Essa manifestação clínica ocorre principalmente em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Os casos de LCD no Brasil devem-se à infecção por *L. amazonensis* e se concentram, principalmente, nos estados do norte e nordeste do país (MARSDEN, 1986; BRASIL, 2010).

A coinfecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um agravante para todas as formas clínicas de LT, reduzindo a resposta imunológica celular e aumentando as recidivas. Variações no espectro clínico são comuns na coinfecção *Leishmania*/HIV tornando-se um obstáculo para o diagnóstico da doença, no entanto as variações na apresentação clínica entre pacientes infectados pelo HIV e não infectados e os fatores relacionados a um resultado desfavorável são pouco estudados (COTA et al., 2014). As lesões ulceradas são as mais comuns, no entanto, lesões atípicas, caracterizadas por máculas ou pápulas disseminadas podem ser encontradas (BRASIL, 2011).

Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LT é realizado através da visualização de lesões sugestivas da doença, juntamente com os dados epidemiológicos, que são de grande importância. Entretanto, pode não ser suficiente para elucidar o diagnóstico, tendo em vista que, doenças de outras etiologias com espectro clínico semelhante ao das leishmanioses, tais como

hanseníase, câncer de pele e tuberculose, são muitas vezes presentes em áreas endêmicas para LT (GONTIJO & CARVALHO, 2003; REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

Diagnóstico laboratorial

Analisando os dados disponibilizados no SINAN pelo MS no Brasil, 16,2% dos casos notificados entre 2007 e 2012 tiveram diagnóstico de LT firmado apenas por critério clínico-epidemiológico, com aumento de 19% de 2008 para 2011, e posterior queda. Estes dados são preocupantes, pois representam alto percentual de diagnóstico sem confirmação laboratorial. A taxa mostra ainda a dificuldade de acesso a diagnóstico adequado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Assim, o diagnóstico laboratorial é essencial e pode ser realizado através de métodos: parasitológicos, imunológicos e moleculares (BRASIL, 2011).

a) Diagnóstico parasitológico

Os exames parasitológicos são realizados através da demonstração direta do parasito, do seu isolamento em cultivo "*in vitro*" e, mais raramente, no seu isolamento "*in vivo*". São considerados métodos de referência para confirmação do diagnóstico da doença porque possibilitam a visualização direta do parasito. No geral, são métodos simples e específicos, estando a taxa de positividade destes testes relacionada a diferentes parâmetros, tais como tempo de evolução da lesão, carga parasitária, espécie de *Leishmania*, local da lesão, habilidade do profissional e número de amostras examinadas (DA SILVA et al., 2005).

A demonstração direta do parasito consiste na pesquisa de formas amastigotas por microscopia, realizada em material obtido através de punção aspirativa, escarificação das bordas ou imprints das biópsias da lesão. A punção aspirativa pode ser realizada após injeção de 3 mL de solução salina estéril na borda da lesão ou linfonodo. A técnica de escarificação é um dos métodos mais simples e antigos em uso, consistindo de uma raspagem na borda interna da úlcera ou da superfície de lesão fechada, utilizando-se lâminas de bisturi estéreis ou estilete (SILVA, 1915). Para a realização dos imprints realiza-se delicada compressão de fragmento de tecido, obtido por biópsia, sobre uma lâmina de vidro. Na rotina diagnóstica, os métodos parasitológicos são considerados de primeira escolha, por serem rápidos de realizar, de simples execução e baixo custo (BRASIL, 2010).

De Melo et al. (2011) comparam o desempenho da escarificação da borda externa e interna da lesão e biópsia de lesão com o da cultura de fragmentos de lesão, proveniente de amostras de pacientes com LC e observaram 42,5% de sensibilidade em escarificação de borda externa; 62,5% em borda interna e 70% em biópsia. Cabe destacar que a biópsia é um procedimento que requer profissional especializado.

A sensibilidade do teste também varia de acordo com as fases e formas clínicas da doença. Na maioria dos casos há abundância de parasitos em lesões recentes, já na fase crônica ocorre redução da carga parasitária e os parasitos tornam-se cada vez menos abundantes, o que torna mais difícil o diagnóstico, sendo assim, quanto maior o tempo de evolução, menor o número de parasitos na lesão e menor a positividade dos métodos parasitológicos. Na forma clínica difusa existe abundância de parasitos na lesão e estes aumentam a positividade do exame parasitológico. Já na forma mucosa, devido a sua reação inflamatória exacerbada, o número de parasitos é pequeno e consequentemente, uma redução na sensibilidade da técnica é observada (CUBA CUBA et al., 1980; BRASIL, 2013).

No isolamento em cultivo, o material biológico proveniente de lesões ou fragmento de biópsia é inoculado em meios de cultivo, nos quais os parasitos se desenvolvem bem. A cultura deve ser mantida por um mês sob observação, mas, sabe-se que, após o quinto dia formas promastigotas do parasito já podem ser encontradas (BRASIL, 2013). A sensibilidade da cultura com fragmentos de biópsias depende dos cuidados durante a coleta, tais como desinfecção da lesão, acondicionamento do fragmento em solução salina com antibiótico, armazenamento e processamento do material. Essas medidas evitam que as culturas sejam contaminadas por bactérias e fungos, que interferem no crescimento das leishmânias e diminuem a possibilidade de isolamento (DA-CRUZ & PIRMEZ, 2005).

Já no isolamento "*in vivo*", as amostras coletadas são trituradas e inoculadas por via intradérmica em animais de laboratório, de preferência hamster (*Mesocricetus auratus*), sendo que, as lesões se desenvolvem após um mês. A associação entre microscopia e cultura pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico para mais de 85% (SCHMITT et al., 2012). Embora os métodos para isolamento em cultivo sejam específicos, são pouco utilizados pelo seu alto custo e tempo prolongado para obter-se resultado (RAMIREZ et al., 2000; VEGA-LÓPEZ, 2003).

b) Diagnóstico imunológico

Entre os exames imunológicos disponíveis, pode-se destacar a intradermorreação de Montenegro (IDRM), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (BRASIL, 2013). De modo geral, o diagnóstico por detecção de anticorpos é limitado, pois a sensibilidade e a especificidade de tais métodos dependem do tipo, fonte e pureza do antígeno utilizado, uma vez que antígenos de *Leishmania* spp. têm epítopos comuns com outros microrganismos, que podem provocar reação cruzada, particularmente, com *Trypanosoma,* micobactérias*, Plasmodium* e *Schistosoma* (KAR, 1995).

A IDRM é um método imunológico que se baseia na reação de hipersensibilidade tardia desenvolvida a partir da aplicação intradérmica de antígenos de *Leishmania* spp. Por ser uma técnica de baixo custo e simples realização, que não requer equipamentos, infraestrutura e profissionais especializados, vem sendo utilizada desde 1926, quando foi descrita e desenvolvida para o diagnóstico da doença. Trata-se de um método de diagnóstico complementar amplamente utilizado e em algumas regiões, o único disponível. O resultado do teste é obtido em 48 ou 72 horas, sendo este considerado positivo quando surge no local da aplicação do antígeno, enduração com 5 milímetros ou mais de diâmetro (MONTENEGRO, 1926).

O antígeno para a IDRM utilizado na rede pública é produzido com a cepa referência PH8 (IFLA/BR/1967/PH8) de *L. amazonensis* pelo Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI) do Paraná. A exclusividade da produção do antígeno de Montenegro pelo CPPI causou desabastecimentos temporários durante 2015 e levou a interrupção total da produção em 2016. O teste não distingue infecção ativa de passada, na maioria das vezes permanece positivo após o tratamento e pode apresentar resultado positivo na infecção assintomática. A positividade estimada do teste na forma cutânea e mucosa é de 84 e 100%, respectivamente. Já na forma difusa e em pacientes imunossuprimidos o teste apresenta resultado negativo (MONTENEGRO, 1926; SHAW, 1975).

A RIFI é o principal método imunológico utilizado no Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB) do Brasil para o diagnóstico das leishmanioses. A técnica consiste em aderir antígenos constituídos de promastigotas mortas de *Leishmania* spp. em lâminas de microscopia para fluorescência, onde é processada a reação com o soro a ser testado. O resultado é dado em títulos e significa a diluição máxima em que ainda foram vistos parasitos com fluorescência verde (BRASIL, 2013).

Entre as poucas vantagens da RIFI está a sua produção em escala nacional por Biomanguinhos – unidade da FIOCRUZ no Rio de Janeiro. Apesar da produção nacional, o teste apresenta a desvantagem de requerer infraestrutura laboratorial (geladeira, pipetas, estufa e microscópio de imunofluorescência) e microscopista treinado, estando restrito a laboratórios especializados. Além disso, apresenta resultados variáveis na LT, que podem ser justificados pela reduzida antigenicidade do parasito e pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Os títulos são significativamente mais elevados em pacientes que apresentam múltiplas lesões, refletindo a maior antigenicidade induzida pelo maior número de parasitos (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Na forma cutânea difusa a RIFI é frequentemente negativa, pela baixa resposta imune celular que caracteriza esta apresentação clínica. A sensibilidade na forma cutânea foi estimada em 71% e na forma mucosa 100% (MENDONÇA et al., 1988; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

O desempenho da RIFI é insuficiente, com sensibilidade de 79,6% em pacientes com lesões ulceradas por *L. braziliensis* e 71,7% em pacientes com lesões por *L. guyanensis* (ROMERO et al., 2005). A reatividade cruzada na presença de outras doenças é frequente, principalmente, com outras infecções por protozoários (PEDRAS et al., 2003).

Os ensaios imunoenzimáticos detectam anticorpos específicos contra o parasito e têm seu desempenho diretamente influenciado pelo antígeno utilizado. São métodos bastante produtivos, entretanto requerem infraestrutura laboratorial (geladeira, pipetas e leitor de ELISA) e profissional especializado, além de demandarem várias etapas de incubação e relativo tempo (BRASIL, 2013).

Três kits de ELISA apresentavam registros vigentes na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2016, são eles: *Leishmania* Cutânea IgG CELISA produzido pela Cellabs Pty Ltd da Austrália, *Leishmania* Elisa IgG+IgM produzido pela Vircell S.L.-Espanha, RIDASCREEN® *Leishmania* Ab produzido pela R-Biopharm AG da Alemanha e NovaLisa™ *Leishmania infantum* IgG – ELISA produzido pela Novatec Immundiagnostica GMBH da Alemanha (ANVISA, 2016). A princípio, esses produtos disponíveis no Brasil foram desenvolvidos para o diagnóstico da LV e são usados para o diagnóstico da LT. A exceção é o kit ELISA *Leishmania* Cutânea IgG CELISA, específico para LC. Estes testes não têm estudos de validação e não estão disponíveis informações sobre seu desempenho.

As proteínas de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) são os antígenos mais estudados para o diagnóstico das leishmanioses, porém reação cruzada tem sido relatada

com outras doenças, principalmente, com doença de Chagas (ROFFI et al., 1980; GUIMARÃES et al., 1991; ROMERO et al., 2005).

c) Diagnóstico molecular

Dentre os métodos de diagnóstico molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido a técnica mais avaliada nas últimas décadas. A PCR é uma técnica altamente sensível, sendo capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fentograma de ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasito e amplificá-lo em escala exponencial (DE BRUIJN & BARKER, 1992). O desempenho do teste depende de vários fatores, dentre eles: as condições físico-químicas da reação, a concentração e a natureza do DNA da amostra e os iniciadores selecionados para a região alvo (BASTIEN et al., 2008). A técnica é amplamente utilizada na pesquisa, mas pouco utilizada na rotina de diagnóstico e restrita a centros de referência, devido ao seu alto custo, necessidade de profissional treinado e infraestrutura laboratorial (geladeira, pipetas, capelas de fluxo laminar e termociclador) (ADHYA et al., 1995; DISCH et al., 2004).

Em estudo realizado por Pirmez et al. (1999) 97% de sensibilidade foi observada para a PCR convencional em pacientes com LC e 71% em pacientes com LM. Os primers utilizados nesta técnica são derivados de uma região conservada do DNA mitocondrial e amplificam um fragmento de 120 pares de base (pb) de todas espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. Safaei et al. (2002) avaliaram o uso da PCR convencional em amostras de biópsias de pele embebidas em parafina para diagnosticar LC. O alvo para amplificação foi o fragmento de 120 pb da região de mini círculos de DNA do cinetoplasto, presente em todas as espécies de *Leishmania*. A sensibilidade e especificidade do método foram de 92 e 100%, respectivamente. Além do bom desempenho apresentado pela PCR no diagnóstico das diferentes formas clínicas de LT, essa técnica ainda apresenta como vantagens o fato de poder utilizar amostras estocadas (como exemplo, embebidas em parafina) e também amostras que não passaram por nenhum preparo (DE BRUJIN et al., 1993; DEGRAVE et al., 1994).

Atualmente, existem quatro kits de diagnóstico molecular disponíveis comercialmente em outros países, sendo um em plataforma PCR, dois em PCR tempo real e um teste com revelação em fita, com leitura visual: *Leishmania* Oligo C-Test (relatório realizado pelo grupo de pesquisas clínicas e políticas públicas de doenças infecciosas e parasitárias (PCPPDIP) do CPqRR/FIOCRUZ, 2016). Apenas o último tem estudo fase II,

com sensibilidade de 72 a 92%, em amostras de aspirado e raspado de lesão, respectivamente (ESPINOSA et al., 2009).

2.2.2 Leishmaniose visceral

A LV é uma doença sistêmica, que acomete órgãos ricos em fagócitos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea. É uma doença grave, crônica, cuja letalidade pode alcançar 90% nos casos não tratados (MELO et al., 2004). De todos os casos de LV, 90% estão concentrados em seis países: Bangladesh, Sudão, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Brasil (ALVAR et al., 2012). Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países, ocorrendo desde o México até a Argentina. No período de 2001 a 2013, 45.490 casos de LV foram registrados nas Américas, com média anual de 3.499 casos, sendo que 96% desses ocorreram no Brasil (OPAS, 2015).

No Brasil, no período de 2007 a 2013 foram notificados 26.112 mil casos de LV, com média anual de 3.730 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Entretanto, estes números podem não refletir a realidade visto que Maia-Elkhoury et al. (2007) estimaram 42% de subnotificação no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) em relação ao Sistema de Informações Hospitalares no período entre 2002 e 2003.

A LV era, primariamente, uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural no Brasil. Devido às transformações ambientais, fatores socioeconômicos e de infraestrutura a doença recentemente vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte (GONTIJO & MELO, 2004; CARDIM et al., 2013) e se tornou crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano (BRASIL, 2006; 2011).

Em ambiente urbano, o principal reservatório do parasito é o cão doméstico, que apresenta susceptibilidade à infecção por *L. infantum* e alto parasitismo cutâneo, facilitando a manutenção do ciclo pelo vetor (COURA-VITAL et al., 2011).

A infecção pode apresentar-se como assintomática, subclínica ou com manifestações clínicas. Estima-se que em uma área endêmica, aproximadamente 20% das pessoas desenvolvem a doença clássica clinicamente manifesta (BRASIL, 2011). Portanto, a maioria dos infectados desenvolve doença subclínica, a qual pode permanecer completamente assintomática ou assumir a forma oligossintomática (BADARÓ et al., 1986; COSTA et al., 1995; CALDAS et al., 2001).

Nas últimas décadas, as leishmanioses, em particular a LV, têm sido reconhecidas como uma doença oportunista em pacientes imunossuprimidos, particularmente em doentes infectados com HIV. A imunossupressão em pacientes coinfectados tem como consequências a redução na resposta terapêutica, limitações no diagnóstico, alta mortalidade e maior possibilidade de recidivas (ALVAR et al., 1997; LOPEZ-VELEZ et al., 1998; PINTADO et al., 2001a; COTA, 2011; SOUZA-GOMES et al., 2011; COTA et al., 2014).

Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LV é complexo, pois a condição apresenta sintomas semelhantes à outras doenças infecto-parasitárias e contagiosas que acometem os seres humanos. O quadro clínico da doença pode variar desde assintomático até forma grave (BADARÓ et al., 1986). A forma clássica apresenta os seguintes sinais e sintomas: febre, hepatomegalia e esplenomegalia. Habitualmente a febre é o primeiro sinal da doença, está presente em todo o curso da infecção e se associa a hiporexia e ao emagrecimento (BADARÓ et al., 1986). Alguns casos também podem apresentar tosse, edema de membros inferiores, icterícia e dor abdominal. Menos comuns são diarreias e vômitos. Em casos de óbito, normalmente este é determinado pelas hemorragias e comorbidades subsequentes a infecção (MICHALICK & GENARO, 2005; BRASIL, 2014).

Quando a doença ocorre de forma mais discreta ou oligossintomática, normalmente os pacientes se curam espontaneamente, sendo a sintomatologia facilmente confundida com a de outras doenças febris ou simplesmente não são diagnosticados (BADARÓ et al., 1986; BRASIL, 2014).

Diagnóstico laboratorial

No Brasil, dentre os casos novos que foram notificados de 2007 a 2012, 86,8% foram considerados “confirmados laboratorialmente”, o que inclui diferentes possibilidades de abordagem e de grau de certeza sobre a presença da infecção. Apesar de alguma variação anual no decorrer do período estudado, observa-se que, em média, aproximadamente 13% dos pacientes tiveram diagnóstico de LV firmado apenas por critério clínico-epidemiológico (MINISTÉRIO DA SAÙDE, 2015). A falta de acesso ao arsenal propedêutico é preocupante, principalmente considerando a inespecificidade do

quadro clínico. Nesse contexto, o diagnóstico laboratorial é essencial e pode ser realizado por exames parasitológicos, imunológicos e moleculares (BRASIL, 2014).

a) Diagnóstico parasitológico

Os exames parasitológicos permanecem como métodos de referência no diagnóstico da LV, baseando-se na visualização direta do parasito e no seu isolamento em cultivo. Este pode ser realizado em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. O material obtido pode ser empregado para confecção de esfregaços ou impressão em lâminas, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório.

O aspirado de baço é o método que oferece maior sensibilidade (93,1-98,7% em pacientes imunocompetentes), entretanto, o procedimento apresenta risco de hemorragia (SIDDIG et al., 1988; ZIJLSTRA et al., 1992). Srivastava et al. (2011) relatam dois sangramentos fatais em 9612 aspirados esplênicos realizados na Índia, durante um período de 10 anos.

No Brasil, o MS recomenda a realização do exame parasitológico por punção de medula óssea, embora esse também seja um método invasivo e doloroso, que requer profissional especializado e infraestrutura. Este método apresenta baixo desempenho, entre 60 a 85% de sensibilidade em pacientes imunocompetentes, porém é mais aconselhável por apresentar menor risco ao paciente (HO et al., 1984; SUNDAR & RAI, 2002). Em pacientes coinfectados, a pesquisa direta em aspirado de medula óssea apresenta sensibilidade entre 67 a 94% (MONTALBAN et al., 1990; ALTES et al., 1991; DEREURE et al., 1995; PINTADO et al., 2001a). O custo direto do aspirado de medula óssea no Brasil foi estimado em R$ 59,33 (MACHADO DE ASSIS et al., 2015).

O isolamento em meio de cultura *in vitro* pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico, entretanto, a técnica é demorada e restrita a centros de referência. Utilizando aspirados de baço e medula óssea para realizar o cultivo, a positividade pode atingir mais que 80% (GUERIN et al., 2002; SUNDAR & RAI, 2002). Nos pacientes imunossuprimidos a cultura apresenta sensibilidade de 63 a 100% com aspirado esplênico (LOPEZ-VELEZ et al., 1998; PINTADO et al., 2001a) e 50 a 100% com aspirado de medula óssea (ALVAR et al., 1997; PINTADO et al., 2011b). A cultura de *Leishmania* spp. na rotina clínica pode complementar a abordagem diagnóstica, diante de falhas nas metodologias convencionais e também para permitir o isolamento e a caracterização da espécie, quando necessário.

O material biológico obtido por punção aspirativa ou por biópsia é inoculado em meios de cultura especiais axênicos. As culturas devem ser mantidas entre 24 e 26ºC e observadas em microscopia semanalmente, durante quatro semanas com o objetivo de visualizar formas promastigotas do parasito (SUNDAR & RAI, 2002; BRASIL, 2014).

Recentes modificações foram descritas no isolamento "*in vitro*" e permitiram um aumento na sensibilidade da cultura de *Leishmania* spp., tais modificações envolvem o uso de creme leucocitário e células mononucleares de sangue periférico pelo método de microcultura. Entretanto, a contaminação do meio de cultura por bactérias, leveduras ou fungos geralmente dificulta o diagnóstico, sendo necessário realizar o teste com boas técnicas estéreis e também acrescentar, ao meio de cultura, antibióticos e antimicóticos (SCHUR et al., 2001; ALLAHVERDIYEV et al., 2005; MAURYA et al., 2010).

O parasito pode também ser visualizado após a inoculação de amostras infectadas em animais de laboratório (como exemplo, hamsters), com sensibilidade acima de 90% em pacientes imunocompetentes (BRYCESON, 1996; SUNDAR & RAI, 2002). A inoculação pode ser realizada com amastigotas ou promastigotas, por diferentes vias, sendo as mais comumente utilizadas a via intraperitoneal e interna, no baço. O animal é examinado semanalmente quanto a sinais de infecção e após quatro meses, amostras de fígado e de baço desses animais podem ser examinadas quanto à presença do parasito (SUNDAR & RAI, 2002). Este método não tem valor prático no diagnóstico da LV, uma vez que vários meses podem ser necessários para obter-se o resultado.

b) Diagnóstico imunológico

Os principais métodos utilizados para diagnóstico da LV são: a RIFI, o ELISA, o teste de aglutinação direta (DAT) e os testes rápidos.

A RIFI é o principal método imunológico utilizado no SISLAB do Brasil para o diagnóstico da LV. A técnica consiste em aderir antígeno constituído de promastigotas mortas de *Leishmania* spp. em lâminas de microscopia para fluorescência, onde é processada a reação com o soro a ser testado. O resultado é dado em títulos e representa a diluição máxima em que foram visualizadas promastigotas. Entre as poucas vantagens da RIFI está a sua produção em escala nacional por Biomanguinhos – unidade da FIOCRUZ no Rio de Janeiro. Apesar da produção nacional, o teste apresenta a desvantagem de requerer infraestrutura laboratorial, entre outras citadas anteriormente no texto (BRASIL, 2014). Assim como observado para LT, apresenta baixo desempenho para diagnóstico da LV, com valores de sensibilidade e especificidade muito variados.

Em pacientes imunocompetentes a sensibilidade do kit fornecido por Bio-Manguinhos varia de 61,5 a 92% e especificidade varia de 80 a 88,5% (PEDRAS et al., 2008; MACHADO DE ASSIS et al., 2008, 2012; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2012). Cota et al. (2013) avaliaram o desempenho da RIFI em imunocomprometidos e encontraram sensibilidade variando de 60,9 a 61,5% e a especificidade variando de 87,1 a 89,5%. O custo direto da RIFI no Brasil foi estimado em R$ 27,71 (MACHADO DE ASSIS et al., 2015).

O ELISA também tem sido amplamente aplicado ao diagnóstico da LV, principalmente em laboratórios privados. É uma técnica que permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, entretanto exige infraestrutura laboratorial, relativo tempo para incubação e profissionais capacitados. A sensibilidade do teste varia de acordo com a metodologia utilizada e a especificidade está intimamente relacionada ao antígeno escolhido.

O antígeno solúvel bruto preparado a partir de suspensão de promastigotas em solução salina tamponada com fosfato frequentemente é utilizado em ELISA. A sensibilidade do ELISA utilizando este antígeno varia e 79 a 100% e a especificidade de 71 a 100% (SUNDAR & RAÍ, 2002; PEDRAS et al., 2008; MACHADO DE ASSIS et al., 2008b). Para superar a baixa especificidade do teste com antígenos não purificados, estudos comparando o desempenho de proteínas sintéticas e recombinantes têm sido realizados. O ELISA utilizando o antígeno recombinante K39 (rK39) mostrou sensibilidade variando de 88,6 a 97% e especificidade entre 84 e 94% (PEDRAS et al., 2008; MACHADO DE ASSIS et al., 2008; 2009). Maia et al. (2012) em uma metanálise avaliaram o desempenho do ELISA utilizando o antígeno bruto de *Leishmania* spp. e o rK39, apresentando sensibilidade de 87 e 92% e especificidade de 77 e 81%, respectivamente.

Três kits de ELISA apresentam registro vigente na ANVISA em 2016: o *Leishmania* Elisa IgG+IgM fabricado pela Vircell S.L.-Espanha e distribuído através da empresa Virion Diagnostica Ltda, o NovaLisa™ *Leishmania infantum* IgG – ELISA fabricado por Novatec Imunodiagnóstica GMBH-Alemanha e distribuído pela Argoslab Distribuidora de Produtos para Laboratórios Ltda e RIDASCREEN® *Leishmania* Ab fabricado pela R-BIOPHARM AG-Alemanha e distribuído pela Resserv Comércio de Produtos Diagnósticos LTDA (ANVISA, 2016). Embora esses kits sejam comercializados no Brasil e utilizados em alguns laboratórios privados, não foram realizados estudos para avaliar o desempenho e validar o uso dos mesmos no país.

O DAT foi primeiramente descrito para o uso no diagnóstico da LV por El Harith em 1986 e desde então tem sido avaliado e aperfeiçoado (EL HARITH et., 1986). O teste é baseado na reação de antígenos (promastigotas) com anticorpos anti-*Leishmania*, que após o período de incubação resulta em reação de aglutinação. Quando descrito, o DAT foi desenvolvido como solução aquosa que apresentava baixa estabilidade e demandava cadeia fria para o armazenamento. Para superar estas limitações, uma modificação na produção do antígeno foi realizada e o antígeno passou a ser produzido sob a forma liofilizada, que pode ser armazenado à temperatura ambiente durante pelo menos dois anos, permitindo assim a sua utilização em áreas endêmicas. A modificação do antígeno conferiu ao teste 92% de sensibilidade e 99,7% de especificidade (MEREDITH et al., 1995). Atualmente há dois Kits DAT que são produzidos e comercializados por duas instituições europeias, o Royal Tropical Institute na Holanda e o Prince Leopold Institute na Bélgica. O custo aproximado destes kits disponíveis comercialmente é de US$6 a U$$8.00 por teste (Edward José Oliveira, informação pessoal, FIOCRUZ).

Pedras et al. (2008) padronizaram o DAT para detectar anticorpos antipromastigotas de *Leishmania chagasi* (DAT-LPC) com sensibilidade de 95% e especificidade de 88,6% para o diagnóstico da LV em pacientes imunocompetentes. No entanto, o teste apresentava algumas variações entre lotes na produção do antígeno. Oliveira et al. (2009) apresentaram modificações nos reagentes e no processo de preparação do antígeno e os resultados do DAT-LPC com o antígeno modificado foram 93,4% de sensibilidade e 96,9% de especificidade. Com estas alterações na preparação antigênica foi possível reduzir as variações entre os lotes e obter-se um alto desempenho.

Recentemente, foi avaliado um protótipo de kit do DAT-LPC com antígeno de promastigotas de *L. infantum* e demais reagentes, apresentando 99% de sensibilidade e 98,2% de especificidade em imunocompetentes (OLIVEIRA et al., 2013) e 87,8% de sensibilidade e 82,3% de especificidade em imunocomprometidos (COTA et al., 2013). O custo direto do DAT-LPC foi estimado em R$12,02 (MACHADO DE ASSIS et al., 2015).

Os ensaios imunocromatográficos comumente conhecidos como testes rápidos representaram um avanço no diagnóstico da LV e são recomendados, principalmente, na assistência primária à saúde, posto que são testes simples, rápidos, de fácil interpretação e com baixo custo, possibilitando redução entre o tempo de diagnóstico e o tratamento. Para a execução do teste não são necessários equipamentos laboratoriais sofisticados e estes utilizam pequeno volume de sangue ou soro, fornecendo resultado em curto tempo (30 a 60

minutos) (SUNDAR & RAI, 2002; MACHADO DE ASSIS et al., 2008; CUNNINGHAM et al., 2012).

Nos ensaios imunocromatográficos, o antígeno é imobilizado em tiras de nitrocelulose para se ligar aos anticorpos específicos presentes nas amostras. Até o momento, o rK39, é o mais utilizado em testes rápidos (BURNS et al.,1993).

Em 2010, o MS introduziu o teste rápido Kalazar-Detect™ (InBios Internacional, Seattle, EUA) em serviços de saúde do país, mesmo na ausência de estudos de validação. Posteriormente, estudos avaliando o desempenho do teste no Brasil mostraram sensibilidade em imunocompetentes variando de 72,4 a 90% e especificidade de 90,6 a 100% (CARVALHO et al., 2003; CUNNINGHAM et al., 2012; PERUHYPE-MAGALHÃES et al. 2012; MOURA et al., 2013) e em coinfectados sensibilidade de 46,6% e especificidade de 97,1% (COTA et al., 2013).

A partir do estudo de validação do IT LEISH® produzido pela BIO-RAD Latino America S.A, o MS publicou a Nota Informativa nº 29 de 2014 (CGDT/Devit/ SVS-MS) comunicando a substituição do Kalazar-Detect™ pelo IT LEISH®, visto que o IT LEISH® pode ser realizado em amostras de soro, plasma e em sangue total coletado por punção digital, dispensando a centrifugação das amostras, permitindo o uso à beira do leito hospitalar ou na atenção primária, proporcionando descentralização do diagnóstico e um resultado mais rápido (MACHADO DE ASSIS et al., 2008; BRASIL, 2014). O custo direto do Kalazar-Detect™ e do IT-LEISH® foi estimado em R$14,85 e R$14,63, respectivamente (MACHADO DE ASSIS et al., 2015).

O IT LEISH® tem apresentado desempenho satisfatório no país em pacientes com LV sem infecção concomitante por HIV, com sensibilidade variando de 92 a 93% e especificidade variando de 95,6 a 97% (MACHADO DE ASSIS et al., 2008; CUNNINGHAM et al., 2012). Os autores sugerem que essas diferenças de desempenho podem estar relacionadas as diferentes espécies do parasito e diferentes concentrações de anticorpos devido à idade, resposta imune e estado nutricional do indivíduo.

Atualmente o IT LEISH® é o teste rápido fornecido pelo MS. Seu processo de implantação, com capacitações presenciais e/ou videoconferências, teve início em 2015. Em Minas Gerais o teste está disponível em 38 municípios, abrangendo 18 das 28 unidades regionais de saúde, e seu fornecimento é realizado de acordo com a demanda através de formulário específico encaminhado para Secretaria de Estado de Saúde (SES, 2016).

c) Diagnóstico molecular

Dentre os métodos moleculares, a PCR é amplamente utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias desde 1980. Apesar de inúmeros estudos na área poucos kits comerciais estão disponíveis devido à falta de padronização. Portanto, o uso da técnica está restrito aos centros de referência e laboratórios de pesquisa (VASOO & PRITT, 2013).

Essa técnica tem como vantagens o alto desempenho, resultado confiável e, além disso, pode ser aplicada em várias amostras biológicas como sangue total, creme leucocitário, aspirado de medula óssea, baço e linfonodos (PIZZUTO et al., 2001; GANNAVARAM et al., 2004). O desempenho do teste está condicionado a algumas variáveis, como o tipo de amostra, o alvo e o método de extração do ácido nucleico (BRASIL, 2014). O custo direto de uma reação de PCR convencional em um centro de referência para LT no Brasil foi estimado em R$75,18 (MACHADO DE ASSIS et al., 2015).

Vários estudos já avaliaram o desempenho da PCR para a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em diferentes amostras biológicas, tais como o aspirado de medula óssea e sangue periférico e mostraram valores de sensibilidade variando de 70% a 100% e especificidade de 87 a 100% (ANDRESEN et al., 1997; LAUCHAUD et al., 2001; DISCH et al., 2003; 2005). O desempenho da PCR foi também avaliado por Machado de Assis et al. (2009) para detectar kDNA de *L. chagasi* em soro para o diagnóstico da LV e observou-se sensibilidade de 85% e especificidade de 100%.

Em estudo de metanálise com o objetivo de avaliar a precisão dos testes moleculares para o diagnóstico da LV em pacientes coinfectados com HIV, foram identificados diversos alvos para a PCR em uso, apresentando sensibilidade de 92% e 98% em amostras de sangue periférico e aspirado de medula óssea, respectivamente (COTA et al., 2012).

A PCR pode ser realizada com inúmeros alvos moleculares, como genes do miniexon, DNA nuclear, RNA ribossômico (rRNA), DNA do cinetoplasto (kDNA) ou sequências nucleares repetidas (LACHAUD et al., 2000; CRUZ et al 2002; CUPOLILLO et al., 2003).

Entre os diferentes tipos de alvos possíveis de serem utilizados na PCR, o kDNA tem sido o mais aplicado. É constituído de uma rede de DNA extra nuclear organizado em milhares de moléculas circulares. Dois tipos de moléculas de DNA estão presentes no cinetoplasto: maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos do kDNA possuem de 20 a 40 kb de tamanho e apresentam em torno de 30 a 50 cópias, já os minicírculos possuem um

tamanho de 1 kb e apresentam 10.000 a 20.000 cópias. Os minicírculos do kDNA de *Leishmania* também são utilizados como alvo de sondas para hibridização com a finalidade de identificar, caracterizar e diagnosticar espécies de *Leishmania*, contribuindo decisivamente para sensibilidade e a especificidade da metodologia em questão (RODGERS, et al., 1990; DEGRAVE et al., 1994; SCHALLIG & OSKAM, 2002). Entretanto, é necessário um consenso para padronizar, simplificar e tornar o custo dessa técnica mais acessível, de forma que esta não fique restrita aos centros de pesquisas e possa ser utilizada no diagnóstico de rotina (GONTIJO & MELO, 2004).

2.3 Políticas Públicas de Ciência, Tecnologia & Inovação

A capacidade de desenvolver novos produtos e processos tecnológicos está relacionada com a influência e oportunidades criadas pelos programas de P&D de um país ou até mesmo instituição (CHIARINI et al., 2012). Para compreender o cenário dos programas de P&D do Brasil será apresentado um histórico das políticas de ciência, tecnologia e inovação (C,T&I), desde a sua criação até os dias atuais.

A inovação é fator determinante para o desenvolvimento econômico-social e competitividade das nações. Diante das iniciativas políticas apresentadas, o Brasil tem se esforçado para atingir uma posição relevante na inovação mundial (CALMANOVICI, 2011). A seguir apresenta-se o conceito de inovação, o perfil inovativo do país e a importância da prospecção de informação tecnológica em patentes como ferramenta para acompanhar o desenvolvimento de novas tecnologias com potencial para constituírem-se em inovações em médio prazo.

O conceito de inovação passou a ter destaque no Brasil a partir de meados dos anos 90 e foi incluído na agenda das políticas industriais e tecnológicas. No ano de 2011, o termo “inovação” foi incorporado ao nome do MCT, junto ao anúncio do PBM. No MCTI, a inovação passou a ser considerada estratégica para o processo de desenvolvimento econômico e social do país, buscando o fortalecimento das ações na área junto às empresas privadas, estados e municípios (VILHA et al., 2013).

No campo da pesquisa, muitas vezes o termo inovação se confunde com invenção. Schumpeter (1942) apresenta uma definição clara para os dois termos. Para o autor, a inovação é concebida como novas combinações de conhecimento e competências existentes, que pode assumir diversas formas: inovação de produto, de processo, inovação organizacional, acesso a novos mercados e descoberta de novas fontes de matérias-primas.

Invenção, por sua vez, é uma ideia, um esboço ou um modelo para um produto, um processo ou um sistema novo ou melhorado. A invenção pode não conduzir necessariamente à inovação. Ela é apenas um ato de criação de novo conhecimento. A inovação é concretizada quando ocorre a primeira transação comercial, ou seja, quando um novo produto ou novo processo de produção chega ao mercado.

Frequentemente, a palavra inovação aparece como sinônimo à produção de novos produtos, processos e serviços intensivos em conhecimento. Nesse sentido, mantém relação com o desenvolvimento científico e tecnológico, razão pela qual se utiliza o termo C,T&I para descrever os principais elementos desse processo dinâmico que oferece impactos ambientais, econômicos e sociais (FUCK & VILHA, 2011).

Segundo Ruivo (1994), o desenvolvimento das políticas de ciência e tecnologia em nível global é dividido em três fases. A primeira inicia-se logo após a Segunda Guerra Mundial, no período entre 1945 e 1965, em que a ciência é considerada força motora do desenvolvimento, baseada na oferta do conhecimento. Na segunda fase, entre 1965 e 1985, a ciência é vista como solucionadora de problemas. Nesta fase, predomina a competitividade industrial e o progresso técnico é liderado pela demanda do mercado. A partir de 1985, a ciência é compreendida como fonte de oportunidade estratégica, formando o complexo que une a ciência e o mercado. Para Guimarães (2006), é a terceira fase que se desenvolve até os dias de hoje.

O Brasil começou a constituir sua política científica e tecnológica a partir da década de 50, procurando se ajustar à tendência dos países líderes mundiais (MOREL, 1979). O marco inicial dessa base foi em 1951, quando o país passou a investir de maneira mais institucionalizada em pesquisa científica, criando o Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e em 1952 fundando o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES). Enquanto o CNPq compromete-se a incentivar a pesquisa, a CAPES é responsável por assegurar a formação de competências para colocar o trabalho na prática, e o BNDES serve como fonte do Governo Federal para o financiamento de longo prazo e investimento em todos os segmentos da economia brasileira (VIOTTI, 2008; OCTAVIANO, 2011).

Foram estabelecidas na década de 60, a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e o Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Essas duas importantes iniciativas a política de C,T&I foram tomadas com o objetivo de aumentar a capacitação para adaptação e geração de tecnologia no país (CAVALCANTE, 2009).

A integração da política científica no planejamento do Estado se destaca na década de 70, com a formulação do "Plano Básico de Desenvolvimento Científico e Tecnológico", elaborado para articular as metas e ações na área de C,T&I e o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), caracterizando uma política voltada para a formação de recursos humanos de pós-graduação e instituições de pesquisa. Neste mesmo período, foi criado o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) em substituição ao antigo Departamento Nacional de Propriedade Industrial. Com essas iniciativas de integração entre o setor produtivo, universidades e centros de pesquisa, prevaleceram, na prática, políticas que se apoiavam no modelo linear de inovação e impulsionava o desenvolvimento do país, tanto com fortes investimentos na infraestrutura industrial, quanto na busca de autossuficiência nos campos da ciência e tecnologia (VIOTTI, 2008; CAVALCANTE, 2009).

Durante a década de 1980, os esforços são interrompidos ou entram em estado latente diante da crise econômico-financeira da economia brasileira. Ainda neste cenário de recessão, em 1985 foi criado o Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT), que executava as ações estabelecidas na política nacional de C,T&I, através das entidades de pesquisa que são a ela vinculadas, das quais se destacavam o CNPq e a FINEP, absorvidas pelo MCT, após a sua criação. A criação do MCT atendeu a uma antiga demanda da comunidade científica, mas não indicava uma estratégia intencional de reforma institucional (VIOTTI, 2008; PACHECO & CORDER, 2010; OCTAVIANO, 2011).

Na década de 1990, o contexto internacional influenciou o rearranjo do sistema de inovação no Brasil. Em 1995 entrou em vigor o Acordo sobre os Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (TRIPS), administrado pela Organização Mundial do Comércio. O TRIPS estabeleceu a harmonização dos sistemas de propriedade intelectual dos países signatários, dando início a um processo de adequação das legislações nacionais aos termos do Acordo. Em relação a patentes, uma das regras gerais estabeleceu a aplicabilidade da proteção patentária para invenções em todos os setores tecnológicos. O TRIPS oferecia flexibilidades, permitindo a adoção tardia de algumas medidas, no caso de países em desenvolvimento. Mesmo com a possibilidade de utilizar esse período de carência, o governo brasileiro entendeu ser pertinente criar rapidamente um ambiente favorável a investimentos estrangeiros e, no ano seguinte, foi promulgada a Lei da Propriedade Industrial, Lei 9.279, de 14 de maio de 1996, adotando, de imediato, todas as disposições do Acordo TRIPS, o que eliminou as restrições existentes no país, à época, relacionadas ao patenteamento de produtos e processos farmacêuticos,

veterinários e agroquímicos. Como as determinações do Acordo TRIPS valorizam os direitos dos titulares de patentes, à época essencialmente empresas estrangeiras, discute-se que a rápida adoção das prerrogativas do Acordo impactou negativamente na capacidade de absorção e desenvolvimento de tecnologias pela indústria nacional (ZEPEDA BERMUDEZ et al., 2000; BARBIERI & CHAMAS, 2006; DE NEGRI & CAVALCANTE, 2013; ECONOMIANET, 2016).

No final da década de 90, constituiu-se os fundos setoriais, instrumentos de financiamento de projetos de pesquisa, abrangendo diversas áreas e setores científicos para superar a instabilidade da alocação de recursos para o financiamento do desenvolvimento científico e tecnológico, com o objetivo de incentivar os investimentos em P&D em setores diversos, oferecendo um fluxo estável e previsível de receitas (PACHECO & CORDER 2010; OCTAVIANO, 2011). Segundo Pacheco (2007), a justificativa para instituir os fundos setoriais baseia-se em três importantes esforços: 1) elaborar e implementar uma clara política nacional de Ciência e Tecnologia (C&T) de longo prazo 2) reestabelecer um sistema de incentivo amplo ao desenvolvimento tecnológico empresarial; e 3) construir um novo padrão de financiamento capaz de responder às necessidades crescentes de investimentos em C&T.

A partir de todos esses aparatos institucionais conquistados lentamente, a década de 2000 é marcada por uma renovação do quadro de iniciativas na área de C,T&I no Brasil, tendo como propósito fortalecer as competências tecnológicas dos atores para inovar. A política de ciência e tecnologia brasileira começa a se consolidar com diferentes acontecimentos estratégicos, com a criação da Lei da Inovação, promulgada em 2004 (Lei nº 10.973/2004), que dispõe de estímulos para dar suporte a condições mais propícias à constituição de parcerias entre universidades, instituições de pesquisa e empresas. Além disso, essa lei estimula à participação de institutos de ciência e tecnologia no processo de inovação e à inovação na empresa através de uma modalidade específica de subvenção ao setor privado. Entre as principais regras de operacionalização da Lei da inovação destacam-se regras sobre os principais tipos de incentivos, o compartilhamento de laboratórios e instalações de Instituição de Ciência e Tecnologia (ICTs) com outras instituições, os incentivos sobre a prestação de serviços e acordos por ICTs com instituições privadas para o desenvolvimento tecnológico (BRASIL, 2004). A lei da inovação proporciona bases para fortalecer a participação das empresas na inovação e contribui para a criação de outros instrumentos que oferecem suporte para essa participação, tais como as incubadoras e parques tecnológicos discutidos mais adiante.

Apesar de estabelecer uma legislação específica para estimular a interação do setor público em atividades de inovação com empresas, a Lei da inovação não foi capaz de promover um avanço na dinâmica inovativa do país. Após alguns anos da vigência dessa lei e análise dos principais pontos que poderiam ser alterados para tornar a lei menos rígida e mais segura foi sancionada a Lei nº 13.243/2016, que apresenta o novo código da C,T&I no Brasil. O novo marco legal altera vários pontos para promover um arcabouço regulatório mais seguro e estimulante para a inovação no Brasil. Entre eles, destacam-se: a formalização das ICTs privadas como objeto da lei e a possibilidade da arrecadação de contrapartidas financeiras; a permissão de utilização de instalações de ICTs públicas seja financeira ou não financeira; a ampliação do papel dos Núcleos de Inovação Tecnológica (NITs); a formalização para concessão de bolsas de estímulo à atividade inovativa; a redução de barreiras para a importação de insumos para P&D entre outros (BRASIL, 2005; RAUEN, 2016).

Em 2005, surgiu a Lei nº 11.196/2005, que passou a ser conhecida como Lei do Bem, estabelecendo a concessão de incentivos fiscais às pessoas jurídicas que realizarem P&D de inovação tecnológica. Ao estimular que as empresas realizem atividades próprias de P&D e adotem mecanismos de pesquisas cooperativas, esta lei torna-se um importante suporte para a construção de um modelo de desenvolvimento sustentável e contribui para que as empresas nacionais possam se tornar eficientes e competitivas. Em 2014, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) recebeu 1.158 formulários de empresas que declararam ter usufruído dos incentivos fiscais no Ano-Base 2013. Este número representa um aumento de 11% em relação ao Ano-Base 2012 (MCTI, 2013).

O MCTI considera que o processo de incubação e programas de incentivo à inovação tecnológica são um dos mais fortes mecanismos de formação de empresas e, a partir desse reconhecimento, foi criado o Programa Nacional de Apoio às Incubadoras de Empresas e Parques Tecnológicos (PNI) em 2009. O programa tem como propósito fomentar a consolidação e o surgimento de parques tecnológicos e incubadoras de empresas que contribuam para estimular e acelerar o processo de criação de micro e pequenas empresas para atividade de inovação tecnológica e a utilização de modernos métodos de gestão (MCTI, 2009). Os parques e incubadoras promovem a interação de instituições e empresas públicas e privadas com a comunidade científica e têm apresentado eficiência na transferência de conhecimento de instituições de ciência e tecnologia para o setor empresarial (MCTI/CDT/UnB, 2014).

Um estudo realizado pelo Centro de apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (CDT) da Universidade de Brasília em 2014, avaliou a situação das diversas iniciativas de implantação de parques científicos e tecnológicos existentes no Brasil e mostrou resultados promissores. Neste estudo, foram identificadas 94 iniciativas de parques no Brasil, nas cinco regiões brasileiras, representando um crescimento de 27% em relação aos dados de 2008. Além dos benefícios na forma de novos empreendimentos empresariais e geração de empregos de alta qualificação e desenvolvimento local e regional, os autores concluíram que os parques científicos e tecnológicos têm gerado cooperações provenientes da tripla hélice envolvendo recursos e esforços dos governos, universidades e instituições de pesquisas e iniciativa privada. O apoio do governo federal foi identificado como instrumento fundamental, principalmente para impulsionar parques em projeto ou em implantação (MCTI/CDT/UnB, 2014).

Quanto às políticas industriais e tecnológicas destacam-se três versões da política industrial no país, são elas: a Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior (PITCE) de 2003 a 2007, a Política de Desenvolvimento Produtivo (PDP) de 2008 a 2010 e o Plano Brasil Maior instituído em 2011. A PITCE estabeleceu instrumentos para eficiência da estrutura produtiva, aumento da capacidade de inovação das empresas brasileiras e expansão das exportações. Com isso, aumentou a competitividade da indústria nos mercados interno e externo. A PDP foi elaborada para dar continuidade ao desenvolvimento conquistado pela PITCE e com objetivo de potencializar à Política Industrial, dando suporte a inovação e a formação de capital como formas de promoção do crescimento sustentável. Em 2011, o Plano Brasil Maior foi instituído para aprimorar os avanços conquistados com as políticas anteriores com o foco de recuperar e aumentar a competitividade da indústria brasileira (BRASIL, 2003; SALERNO & DAHER, 2006; KUPFER, 2013; ABDI, 2016).

Em 2013, os líderes da Mobilização Empresarial pela Inovação, associados à indústria e, junto ao Governo Federal, criam a Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (EMBRAPII), organização social sem fins lucrativos, cuja missão é contribuir para o desenvolvimento da inovação na indústria brasileira através do fortalecimento de sua colaboração com institutos de pesquisas e universidades. Ao compartilhar riscos de projetos com as empresas por meio da divisão dos custos do projeto, estimula-se o setor industrial a inovar mais e com maior intensidade tecnológica. Mesmo sendo uma jovem empresa, a EMPRAPII, fechou o ano de 2015 com 64 projetos no valor total de R$ 120

milhões. Em 2016, está comemorando três anos de incentivo à inovação e inaugurando dez novas unidades credenciadas, sendo três em biotecnologia (EMBRAPII, 2016).

Para dar continuidade aos avanços alcançados no desenvolvimento e inovação do país e também direcionar os investimentos com consistência para potencializar os resultados dos esforços empreendidos pelos atores envolvidos no assunto, foi elaborada a Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação para o período 2016 a 2019 (ENCTI 2016-2019). No escopo dessa iniciativa encontra-se temas estratégicos a serem priorizados em consonância com os desafios elencados e com as diretrizes delineadas para o Sistema Nacional de Ciência e Tecnologia (MCTI, 2016).

2.3.1 Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde

Nos últimos anos, vem se fortalecendo a articulação entre países em torno da ideia de que a Pesquisa em Saúde é uma estratégia importante para a melhoria da situação de saúde das populações, bem como para a tomada de decisões na definição de políticas e no planejamento em saúde pelos gestores. Isso tem contribuído para a melhoria das ações de promoção, proteção, recuperação e reabilitação da saúde e redução das diferenças sociais (SCTIE, 2008).

Para que o SUS possa atender às crescentes demandas sanitárias da população e expandir sua base produtiva é necessário articular a relação entre inovações, estruturas industriais e serviços de saúde, que compartilham o mesmo espaço político-institucional configurando o que se denomina como Complexo Econômico Industrial da Saúde (CEIS). O CEIS é composto por diferentes setores industriais e serviços em saúde, que define três subsistemas: de “base química e biotecnológica”, de “base mecânica, eletrônica e de materiais” e de “serviços de saúde”. De um modo geral, a abordagem para o desenvolvimento do CEIS não tem sido sistêmica, visto que as políticas que impactam o desenvolvimento de serviços e produtos de saúde não têm sido elaboradas e/ou implementadas de forma articulada. Consequentemente, sua base produtiva e tecnológica ainda é bastante frágil, fato que pode ser explicado pelo crescente déficit da balança comercial no setor da saúde (GADELHA et al., 2012). Diante deste cenário, torna-se necessário fomentar o desenvolvimento do CEIS e aumentar a produção nacional de tecnologias.

A Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde (PNCTIS) é parte integrante da Política Nacional de Saúde, formulada no âmbito do SUS. A finalidade da

PNCTIS é contribuir para que o desenvolvimento nacional se faça de modo sustentável, e com apoio na produção de conhecimentos técnicos e científicos ajustados às necessidades econômicas, sociais, culturais e políticas do país, para atender o artigo 200, inciso V, da Constituição Federal que retrata as competências do SUS e, dentre elas, inclui-se o incremento do desenvolvimento científico e tecnológico em sua área de atuação (SCTIE, 2008). Essa política foi baseada em dois princípios elementares: a busca da equidade em saúde e a adesão aos padrões éticos na pesquisa em saúde para evitar a exploração de populações vulneráveis (LABONTE & SPIEGEL, 2003; PANG, 2003).

Uma PNCTIS voltada para as necessidades de saúde da população deverá ter como objetivo principal desenvolver e aperfeiçoar os processos de absorção de conhecimento científico e tecnológico pelas indústrias, pelos serviços de saúde e pela sociedade. E para que essa PNCTIS seja eficiente, a participação do Estado e da sociedade é importante tanto na sua elaboração, quanto na implementação, levando em conta que a saúde é um "bem de todos e um dever do Estado" (GUIMARÃES, 2004).

Dentre algumas realizações conquistadas pela PNCTIS, que tiveram como objetivo impulsionar o desenvolvimento de tecnologia em saúde no país, podemos citar a Lei nº 12349/2010 e o Decreto nº 7.713/2012 acerca das definições do processo licitatório, responsáveis por estabelecer margens de preferências na aquisição de bens e serviços brasileiros em face dos estrangeiros. Essas medidas legislativas preveem margem de preferência de até 25% para a compra de produtores nacionais, sendo que no cálculo deve-se considerar geração de emprego e renda, impacto na arrecadação de impostos, desenvolvimento nacional, entre outros (GADELHA et al., 2010).

Outro ponto importante foi a Portaria nº 837, de 18 de abril de 2012, que define as diretrizes e os critérios para o estabelecimento das Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo. Conforme o art. 2º desta Portaria, as parcerias são realizadas entre instituições públicas e entidades privadas com vistas ao acesso a tecnologias prioritárias, à redução da vulnerabilidade do SUS em longo prazo e à racionalização e redução de preços de produtos estratégicos para saúde, com o compromisso de internalizar e desenvolver novas tecnologias estratégicas e de valor agregado elevado, favorecendo a substituição de importações no âmbito do CEIS (MS, 2012).

Diante da escassez de recursos para pesquisa em saúde, principalmente, nos países em desenvolvimento, associado aos benefícios que essa pesquisa pode proporcionar, é necessário que a aplicação desses recursos esteja baseada em um processo racional de

definição de prioridades. Estabelecer as prioridades é tão importante quanto desenvolver pesquisas (GLOBAL FORUM FOR HEALTH RESEARCH, 2006; FLEURY, 2011).

Para amparar os profissionais e gestores envolvidos na pesquisa, foi estabelecida a criação de uma Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde (ANPPS) em de junho de 2003 e publicada em 2006. A construção e implementação da ANPPS e a ampla participação de atores com experiências e linguagens distintas tanto da pesquisa como da saúde tem como finalidade respeitar as necessidades nacionais e regionais de saúde, e aumentar a indução seletiva para a produção de conhecimentos, bens materiais e processuais nas áreas prioritárias para o desenvolvimento das políticas sociais (GUIMARÃES et al., 2006; SCTIE, 2008b). Essa agenda constituiu-se como o primeiro exercício de definição de prioridades de pesquisa em saúde realizada no Brasil e é composta por 24 subagendas (SCTIE, 2008; AKERMAN & FISCHER, 2014).

Nos últimos anos, a descoberta de novas tecnologias tem proporcionado avanços significativos e impactos na área da saúde. Nesse cenário de aumento contínuo de inovações e dependência tecnológica cada vez maior, a articulação com as ações da PCNTIS e com as prioridades da ANPPS torna-se ferramenta primordial para o país estabelecer um desenvolvimento tecnológico sustentável atendendo as demandas da população. Respaldado pela Lei nº 12.401/2011, novas tecnologias só podem ser incorporadas após a avaliação de sua eficácia, segurança e relação de custo-efetividade, bem como do impacto orçamentário e logístico de sua eventual incorporação no SUS. A seleção racional das tecnologias a serem incorporadas deve ser feita com base nas prioridades nacional, regional e local, cabendo também a essas instâncias o monitoramento de resultados dessas incorporações (BRASIL, 2011; PETRAMALE, 2016).

2.3.2 Políticas de Inovação

Para que a inovação seja concretizada, é necessária a articulação entre a informação produzida, os processos de inserção e os diferentes atores envolvidos. Portanto, tornou-se necessária a implementação de um Sistema Nacional de Inovação (SNI) que seja organizacional e funcional. Basicamente, o SNI é um sistema dinâmico que não depende somente do desempenho de empresas e organizações de ensino e pesquisa, mas também de como elas interagem e contribuem entre si e com vários outros atores, como as instituições, o setor financeiro e as políticas macroeconômicas, que nem sempre estão ligados de forma direta ao desenvolvimento de inovações (GADELHA, 2003; CASSIOLATO E LASTRES,

2005; SZAPIRO, 2005). Dessa forma, a construção desse sistema viabiliza a realização de fluxos de informação necessários ao processo de inovação tecnológica (ALBUQUERQUE, 1996).

Ao analisar a trajetória de desenvolvimento do SNI, pode-se perceber reformulações e recentes avanços, principalmente, nas políticas que o compõem. Porém, o SNI pode ser considerado bastante incipiente e adaptativo para estabelecer uma dinâmica econômica baseada na capacidade inovativa do país (SUZIGAN & ALBUQUERQUE, 2008). Diante do exposto, o Brasil enfrenta desafios estruturais, institucionais, relacionais, políticos e de aprendizagem para sumarizar essas interações, com vistas a ampliar os projetos de parceria empreendidos no país, como também para ampliar as colaborações de alto conteúdo tecnológico, onde as articulações se mostram pouco expressivas (VILHA & MASKIO, 2016)

O Brasil ainda enfrenta um distanciamento considerável entre a produção de conhecimento e a inovação tecnológica. De acordo com Moura e Caregnato (2011), embora patentes e artigos constituam dois elementos autônomos, eles estão inter-relacionados com C&T. Ao analisar a coautoria em artigos e patentes, o estudo aponta que os autores e instituições coativos que mais possuem patentes são também aqueles que mais publicam artigos, pois as análises de correlação apresentaram-se significativas entre artigos e patentes, destacando a interação entre C&T como um mecanismo que pode gerar efeitos positivos na produtividade e no reconhecimento dos autores.

A partir dos dados levantados no relatório *Nature Index* 2015, que mede o impacto da ciência a partir de periódicos, considerando todos os artigos com participação de pesquisadores filiados a instituições brasileiras publicados em 2014, o Brasil ocupa posição de destaque em ranking de qualidade científica: primeiro lugar na América Latina e 23º no ranking global (NATURE INDEX, 2015). Porém, tratando-se de patentes, o crescimento é modesto, representando, em 2014, 1,3% das patentes depositadas no mundo (PIRES et al., 2015).

O relatório da 8ª edição do *Global Innovation Index* 2015 analisou o ambiente de inovação de 141 nações. Este estudo foi realizado pela Universidade Cornell, pela Escola de Pós-graduação em Negócios (INSEAD, França) e pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI) para analisar indicadores relacionados à inovação, política, economia e outros fatores importantes para o desenvolvimento de novas tecnologias e serviços. Os resultados mostraram que o Brasil se encontra na 70ª colocação no ranking Global, representando uma queda de nove posições em relação a 2014. Em relação aos

Países da América Latina e Caribe, o país se encontra na 8ª posição (WUNSCH-VINCENT et al., 2015).

2.4 Proteção Intelectual

Acentuado investimento é requerido em P&D de novos produtos. Neste contexto, proteger a nova tecnologia significa prevenir-se de que competidores copiem e vendam o produto a preço mais baixo. Assim, patentear é uma estratégia valiosa e imprescindível para que a invenção e criação industrializável se torne um investimento lucrativo (INPI, 2014).

Patente é um título de propriedade temporária sobre uma invenção ou modelo de utilidade, outorgado pelo Estado aos inventores, autores, pessoas físicas ou jurídicas detentoras de direitos sobre a criação. Em contrapartida, o inventor precisa revelar detalhadamente todo o conteúdo técnico da matéria protegida pela patente (INPI, 2014b).

De acordo com a Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996, que regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial, é patenteável a invenção que atenda aos requisitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial. Define-se como novidade, todo conhecimento técnico não compreendido no estado da técnica, ou seja, toda gama de informação técnica disponível ao público sob qualquer forma de divulgação. A aplicação industrial refere-se à possibilidade de industrialização do invento. O termo industrial abrange todos os ramos da atividade econômica da fabricação. Já a atividade inventiva significa que a invenção não decorre de maneira evidente ou óbvia do estado da técnica para um técnico no assunto, ou seja, a invenção não pode ser simples substituição de materiais ou ainda simples combinação de meios conhecidos. Estes são os critérios que o pedido de patente deve apresentar para que seja concedida a proteção legal (BRASIL, 1996; BARBOSA, 2003).

No Brasil, o órgão responsável pelo aperfeiçoamento, disseminação e gestão do sistema brasileiro de concessão e garantia de direitos de propriedade intelectual para a indústria é o INPI. Fundado em 1970 é uma autarquia federal vinculada ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.

Ao analisarmos os dados do INPI, percebe-se uma estabilidade no número de depósitos nos últimos três anos, com 34.050 depósitos realizados em 2013 e 33.043 depósitos em 2015. Até maio de 2016 foram realizados 14.455 depósitos, mostrando um aumento quando se compara com o mesmo período em 2015, no qual foram realizados

12.729 depósitos. Em 2015, um total de 33.043 depósitos foram realizados no INPI, cabe ressaltar que desses apenas 4.641 foram depósitos de residentes brasileiros (INPI, 2016).

O sistema de informações de patentes e a propriedade intelectual exercem um papel importante no desenvolvimento tecnológico ao divulgarem as novas invenções, além disso, permitem o monitoramento do desenvolvimento industrial e científico. Os documentos patentários possuem peculiaridades que os tornam uma das mais ricas fontes de informações tecnológicas, uma vez que a descrição técnica da invenção é um dos pressupostos. Por meio destes documentos, é possível obter informações sobre conhecimentos aplicados, base para a criação de novos inventos e modelos de utilidade (FREIRE, 2010; MARTINEZ et al., 2014).

A fim de padronizar os diferentes sistemas nacionais de classificação e permitir a difusão internacional das informações tecnológicas presentes no conteúdo das patentes, foi estabelecido pelo Acordo de Estrasburgo em 1971, um sistema hierárquico de símbolos para a classificação de patentes e modelos de utilidade, distribuindo-se as invenções em áreas técnicas específicas. A Classificação Internacional de Patentes (CIP) é uma ferramenta usada na indexação de documentos e pode ser utilizada como estratégia na prospecção de informações específicas, possibilitando um refinamento na busca de patentes (FERREIRA, 2009).

Através das análises de patentes, é possível realizar a prospecção tecnológica e estudar o ritmo e perfil de patenteamento. Em linhas gerais, prospecção tecnológica pode ser definida como uma estratégia sistemática de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo. Os métodos de prospecção têm sido realizados por organizações públicas e privadas de diversos países, como uma ferramenta para orientar os esforços empreendidos para o desenvolvimento de tecnologias (KUPFER & TIGRE, 2004; MAYERHOFF, 2009).

2.5 Prospecção Tecnológica

Para Bahruth et al. (2006), a prospecção tecnológica divide-se em quatro fases: 1) fase preparatória para estabelecer os objetivos, escopo e a metodologia a ser utilizada; 2) fase pré-prospectiva, na qual a metodologia é detalhada e também o levantamento da fonte de dados; 3) fase prospectiva, fase que se refere à coleta, ao tratamento e à análise dos

dados obtidos; e 4) fase pós-prospectiva, é a fase final do processo e inclui a interpretação dos resultados e a implementação das ações.

Além dos proveitos mencionados anteriormente, o uso das patentes como fonte de informação tecnológica para a geração de mapas de conhecimento tem também como vantagem o fato de que as bases de dados são padronizadas e com qualidade da informação, o que permite tratar estatisticamente volumes de dados com baixo risco de erros e agregando valor ao conhecimento disponível (AMPARO et al., 2012).

Kupfer e Tigre (2004) defendem que diferentes estratégias podem ser adotadas para a prospecção tecnológica, sendo organizadas em três importantes grupos: (*i*) o monitoramento, que se baseia no acompanhamento evolutivo dos fatos e o reconhecimento de fatores passíveis de mudança, realizados de forma contínua e sistemática; (*ii*) a previsão, que é realizada através de projeções com base em informações históricas e modelagem de tendências; e (*iii*) visão, que é definida como antecipação de possibilidades futuras, baseada em interação não estruturada entre especialistas.

O monitoramento é amplamente utilizado, pois constitui fonte básica de informação relevante, dispondo o pano de fundo necessário no qual a prospecção se baseia e pode ser usado para buscar todas as fontes de informação e produzir um amplo e variado conjunto. As principais fontes em que se baseia são as de natureza técnica, tais como revistas, patentes, catálogos, artigos científicos, entre outros. Além dessas, podem ser feitas entrevistas com especialistas e outras informações não literárias podem ser coletadas (PORTER et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

Os resultados obtidos na prospecção tecnológica vêm sendo cada vez mais utilizados como subsídio para apontar entraves do desenvolvimento tecnológico, para servir como potente ferramenta e um instrumento bastante eficaz no apoio à tomada de decisão, tendo em vista o estado da arte disponível no seu conteúdo, que permite identificar tecnologias relevantes, parceiros, concorrentes no mercado, rotas tecnológicas, inovações, investimentos, processos, produtos, fusões e aquisições e também para formular políticas públicas e direcionar focos de P&D para as doenças negligenciadas (AMPARO et al., 2012).

O presente trabalho apresenta uma prospecção e monitoramento tecnológico em documentos patentários e na literatura científica do desenvolvimento de novos produtos para diagnóstico das leishmanioses buscando conhecer o perfil do desenvolvimento tecnológico relacionado às alternativas de diagnóstico para as leishmanioses, entre os anos de 2003-2015, em escala nacional e mundial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o desenvolvimento tecnológico relacionado ao diagnóstico das leishmanioses entre 2003-2015.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar depósitos de patentes quanto aplicação, desempenho, acesso e desenvolvimento adicional relacionados a métodos diagnósticos para as leishmanioses, entre 2003 e 2015;
- Identificar e descrever novas metodologias de diagnóstico para as leishmanioses descritas na literatura científica, entre 2003 e 2015;
- Identificar e descrever produtos diagnósticos para as leishmanioses com potencial para desenvolvimento industrial ou transferência tecnológica;
- Realizar estudo de caso do antígeno recombinante K39.

4 MATERIAL E MÉTODOS

DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de prospecção e monitoramento, de caráter descritivo e analítico.

4.1 Prospecção e análise patentária

O levantamento das informações patentárias relacionadas ao diagnóstico das leishmanioses foi realizado com a colaboração da equipe do Núcleo de Inovação e Tecnológica (NIT) do CPqRR/FIOCRUZ, usando a ferramenta de busca da base de dados Thomson Innovation®, 2014, para o período compreendido entre 01/01/2003 a 01/06/2015. Administrada pela Thomson Reuters©, esta base permite acesso ao texto completo das patentes publicadas nas Américas, Europa e Ásia, incluindo título, resumo, reivindicações, descrição da invenção, inventores, depositantes, data de publicação, entre outros (THOMSON INNOVATION, 2014).

ESTRATÉGIA DE BUSCA

Para a realização da busca, foi utilizada a palavra-chave *leishmani** truncada, combinada, através do operador booleano "AND", com códigos da Classificação Internacional de Patentes (CIP), separados entre si pelo operador booleano "OR". O caractere (*) permite a truncagem, viabilizando a localização de palavras que possuem radical comum e sufixos diferentes. A seleção dos códigos foi feita pela análise de campos tecnológicos possivelmente associados a diagnóstico e/ou tratamento das leishmanioses (WIPO, 2014).

A CIP é formada por um sistema hierárquico de códigos distribuídos inicialmente em oito seções: a) necessidades humanas; b) operações de processamento; transporte c) química; metalurgia d) têxteis; papel e) construções fixas f) engenharia mecânica; iluminação; aquecimento; armas; explosão g) física h) eletricidade. Dentro de cada seção há novas divisões em classes, subclasses e grupos.

Os códigos utilizados na busca encontram-se listados no quadro 1 e estão alocados nas seções: a) necessidades humanas, c) química; metalurgia e g) física.

Quadro 1. Códigos da Classificão Internacional de Patentes utilizados na busca de documentos relacionados ao diagnóstico e tratamento das leishmanioses, na base de dados Thomson Innovation®, entre 2003 e 2015.

Divisão	Código	Descrição
Grupo	A61K 9/00	Preparações medicinais caracterizadas por formas físicas especiais
Subgrupo	A61K 9/127	Dispersões; Emulsões · · Lipossomas
	A61K 31/00	Preparações medicinais contendo ingredientes ativos orgânicos
	A61K 35/66	Preparações medicinais contendo materiais de constituição indeterminada ou seus produtos de reação · Materiais derivados de micro-organismos
	A61K 35/68	· · Protozoários
	A61K 45/00	Preparações medicinais contendo ingredientes ativos não previstos nos grupos A61K 31/00-A61K 41/00
	A61P 17/00	Fármacos para o tratamento de problemas dermatológicos
	A61P 33/00	Agentes antiparasíticos
	A61P 33/02	· Antiprotozoários, p. ex., para leishmaniose, tricomoniase, toxoplasmose · Imunomoduladores
	A61P 37/02	Fármacos para o tratamento de distúrbios imunológicos ou alérgicos
	A61P 37/04	· · Imunoestimulantes
	C07K 14/44	Peptídeos tendo mais de 20 aminoácidos; Gastrinas; Somatoestatinas; Melanotropinas; Derivados dos mesmos · de animais; de seres humanos · · de protozoários
	C07K 14/52	· · Citocinas; Linfocinas; Interferons
	C07K 16/20	Imunoglobulinas, p. ex., anticorpos mono- ou policlonais · contra material de animais ou seres humanos · · de protozoários
	C12Q 1/02	Processos de medição ou ensaio envolvendo enzimas ou micro-organismos (aparelhos de medição ou ensaio ou meios de medir ou de detectar as condições do meio, p. ex., contadores de colônias, C12M 1/34); Composições para esse fim; Processos de preparação de tais composições · envolvendo micro-organismos viáveis
	G01N 33/50	Investigação ou análise de materiais por métodos específicos não abrangidos pelos grupos G01N 1/00-G01N 31/00 · Material biológico, p. ex., sangue, urina (G01N 33/02, G01N 33/26, G01N 33/44, G01N 33/46 têm prioridade; determinação da capacidade germinativa das sementes A01C 1/02); Hemocitrômetros (contagem de glóbulos distribuídos sobre uma superfície realizando a varredura desta superfície G06M 11/02. · · Análise química de material biológico, p. ex., sangue, urina; Testes por métodos envolvendo a formação ligações bioespecíficas de ligantes; Testes imunológicos (processos de

		medição ou testes outros que não os imunológicos envolvendo enzimas ou micro-organismos, composições ou papéis reativos para os mesmos; processos de preparação destas composições, controle de condições responsivas ao meio em processos microbiológicos ou enzimológicos C12Q).
	G01N 33/53	· · · Imuno-ensaio; Ensaios envolvendo ligantes bioespecíficos; Materiais para os mesmos
	G01N 33/569	· · · · para micro-organismos, p. ex., protozoários, bactérias, vírus
	G01N 33/68	· · · envolvendo proteínas, peptídeos ou aminoácidos

FONTE: Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (http://ipc.inpi.gov.br/ipcpub/#refresh=page)

VARIÁVEIS DO ESTUDO

Todos os pedidos de patente encontrados na busca foram exportados para um banco de dados previamente validado por especialistas da área de inovação e em diagnóstico das leishmanioses, desenvolvido em Microsoft Excel (2007). Este banco de dados foi composto por variáveis agrupadas em: 1) Identificação do depósito, 2) Distribuição da tecnologia, 3) Informações do depositante, 4) Conteúdo da patente 5) Desenvolvimento e 6) Status. O detalhamento das variáveis pode ser observado no quadro 2.

Quadro 2. Variáveis pesquisadas nos documentos de patentes e que compuseram o banco de dados.

Identificação do depósito
Variáveis: Número da publicação, Classificação Internacional de Patentes, Título do Derwent World Patents Index (DWPI), Título original, Resumo, Data de prioridade, Data de publicação
Distribuição da tecnologia
Variáveis: Países onde a proteção foi requerida, Depósito no Brasil, Número de países onde a proteção foi requerida
Informações do depositante
Variáveis: Depositante, País do depositante, Tipo de instituição do depositante (Empresa, Universidade, Instituto de pesquisa, Organização sem fins lucrativos, Parceria Público privada)
Conteúdo da patente
Variáveis: Utilidade do conteúdo da patente (Tratamento, Diagnóstico e Tratamento e diagnóstico), Doenças relacionadas nas reivindicações (Leishmanioses; Leishmanioses e outras doenças causadas por protozoários; Leishmanioses e outras doenças infecciosas; Leishmanioses e doenças não infecciosas; Leishmanioses e outras doenças infecciosas e não infecciosas), Produto/ Método relacionado ao tipo de diagnóstico que a patente solicita proteção (Parasitológico; Detecção antígeno, detecção de anticorpo; Molecular e Outro)
Desenvolvimento
Variáveis: Há prova de conceito para leishmanioses no pedido de patente? Houve desenvolvimento adicional da tecnologia para leishmanioses? e Estágio de desenvolvimento da tecnologia
Status

Status jurídico dos depósitos: ativo, abandonado, patenteado ou sem informação

TRIAGEM

Para a análise, considerou-se apenas um documento representativo por família da patente, conforme agrupamento fornecido pelo Thomson Innovation®. Uma família de patentes é um grupo de patentes relacionadas, por meio da prioridade (primeiro depósito) de um documento em particular e normalmente, compreende o mesmo pedido de proteção realizado em diferentes países (ESPACENET, 2014).

Para seleção individual dos documentos de interesse foram considerados os seguintes critérios de inclusão: 1) apresentar reivindicações para diagnóstico e/ou tratamento das leishmanioses; 2) apresentar prova de conceito para leishmanioses, definida como a demonstração experimental de uso da tecnologia para diagnóstico de leishmanioses. Não foram incluídas patentes contendo reivindicações e provas de conceito apenas para vacinas, tratamento, combate a vetores e uso veterinário.

As patentes cujo conteúdo foi publicado na Thomson Innovation® em mandarin ou chinês foram buscadas em outras bases complementares, tais como: European Patent Office, Espacenet, na base de patentes do INPI e no Google patents (EPO, 2014; INPI, 2014; GOOGLEPATENTS, 2014).

CRITÉRIOS E PARÂMETROS UTILIZADOS NA ANÁLISE DAS PATENTES

Foram analisados os principais depositantes, seus países e o tipo de instituição depositante. Principais depositantes foram definidos como os titulares de depósitos com maior número entre os documentos selecionados. Os códigos dos países ou instituição são designados por letras que indicam o país ou a organização em que o pedido de patente foi depositado ou concedido, de acordo com a Thomson Innovation® (Quadro 3). No caso de instituições que possuem unidades em diferentes países, foi considerado o código do país da sua sede.

Quadro 3. Lista de países e seus códigos de acordo com a base de dados internacional Thomson Innovation®.

Código	País ou Organização	Código	País ou Organização
ARIPO	Organização Regional Africana da Propriedade Industrial	IL	Israel
AR	Argentina	IN	Índia
AT	Áustria	IT	Itália
AU	Austrália	JP	Japão
BE	Bélgica	KE	Quênia

BG	Bulgária	KR	República da Coreia
BR	Brasil	LT	Lituânia
CA	Canadá	LU	Luxemburgo
CH	Suíça	MX	México
CN	China	MY	Malásia
CU	Cuba	NL	Holanda
CY	Chipre	NO	Noruega
CZ	República Checa	NZ	Nova Zelândia
DE	Alemanha	OAIPO	Organização Africana da Propriedade Intelectual
DK	Dinamarca	PH	Filipinas
DZ	Argélia	PL	Polônia
EA	Organização Euroasiática de Patentes	PT	Portugal
EE	Estónia	RO	Romênia
EG	Egito	RU	Federação Russa
EP	Organização Europeia de Patentes (OPE/EPO)	SE	Suécia
ES	Espanha	SG	Singapura
FI	Finlândia	SI	Eslovénia
FR	França	SK	Eslováquia
GB	Reino Unido	TR	Turquia
GR	Grécia	TW	Taiwan
HK	Hong Kong	US	Estados Unidos da América
HR	Croácia	WIPO	Organização Mundial da Propriedade Intelectual
HU	Hungria	ZA	África do Sul
IE	Irlanda		

Para o levantamento do número de depósitos relacionados a um dado país, considerou-se a localização da instituição depositante.

Analisou-se também a quantidade de depósitos por tipo de instituição, agrupadas em empresa, os titulares representados por empresas privadas; universidades, os titulares representados por instituições de ensino universitário, privadas ou públicas; institutos de pesquisa, os titulares representados por instituições ou centros públicos de pesquisas; pessoa física, os titulares representados pelo pesquisador ou o grupo de pesquisa; organização sem fins lucrativos, os titulares representados por órgãos governamentais não abrangidos nos itens anteriores; parceria público-privada, os titulares representados por colaborações entre órgãos públicos e empresas privadas; parceria pública, os titulares representados por colaborações entre órgãos públicos e, parceria privada, os titulares representados por colaborações entre órgãos privados. Para a categorização dos depositantes utilizou-se as informações coletadas em seus sites e/ou pesquisas na internet.

Para verificar em quais países foi requerida proteção para as tecnologias, analisou-se a composição da família de patentes de cada invenção identificada no estudo. Considera-se família de patentes o conjunto de documentos de patente publicados em diferentes países relacionados com uma mesma invenção (INIPI, 2014).

A evolução temporal das proteções foi construída com base na data do depósito prioritário, ou seja, a data do primeiro depósito referente a uma dada tecnologia. Foi assim determinado o número de depósitos prioritários por ano, abrangendo informação de todos os pedidos de patente que integraram o estudo.

A análise do conteúdo das patentes consistiu na avaliação da utilidade, foco tecnológico, aplicação e tipo de proteção requerida nos documentos de patente selecionados. Quanto à utilidade das tecnologias, foram definidos o número e o percentual dos pedidos referentes ao diagnóstico e/ou tratamento das leishmanioses. A definição da utilidade das tecnologias, se direcionada para o diagnóstico, tratamento ou ambos, levou em consideração as informações do quadro reivindicatório das patentes.

O foco tecnológico foi definido pela abordagem técnica envolvida em cada invenção, nas categorias parasitológico, relacionado à detecção do parasito; imunológico, no caso da utilização de reações para detecção de antígenos ou de anticorpos; ou molecular, no caso da busca de material genético do parasito.

Para a análise da aplicação das patentes, foram identificadas as doenças para as quais foi requerida proteção no campo de reivindicações dos documentos de patente. Definiram-se cinco categorias, a saber:

1. Leishmanioses: assim classificadas as patentes que possuem reivindicações relacionadas ao diagnóstico e/ou tratamento exclusivamente para este grupo de doenças;
2. Leishmanioses e outras doenças causadas por protozoários: assim classificadas as patentes que possuem reivindicações relacionadas ao diagnóstico e/ou tratamento das leishmanioses e de outras doenças causadas por protozoários;
3. Leishmanioses e outras doenças infecciosas: assim classificadas as patentes que possuem reivindicações relacionadas ao diagnóstico e/ou tratamento das leishmanioses e outras doenças causadas por um agente patogênico como: vírus, bactérias, fungos e protozoários;
4. Leishmanioses e doenças não infecciosas: assim classificadas as patentes que possuem reivindicações relacionadas ao diagnóstico e/ou tratamento das leishmanioses e outras doenças caracterizadas pela ausência de microrganismos;

5. Leishmanioses e outras doenças infecciosas e não infecciosas: assim classificadas as patentes que possuem reivindicações relacionadas ao diagnóstico e/ou tratamento das leishmanioses, de doenças causadas por patógenos e das doenças caracterizadas pela ausência de microrganismos.

Para verificar o estágio de desenvolvimento das tecnologias relacionadas ao diagnóstico, foi realizado levantamento bibliográfico na base de dados PubMed (NCBI, 2015), buscando o nome dos inventores ou da instituição depositante da tecnologia e, quando possível, a tecnologia apresentada. A avaliação do desempenho do teste e sua fase de desenvolvimento (PC: Prova de Conceito, Fase II: Análise de amostras selecionadas, Fase III: Estudos de grupos populacionais, amostras não previamente selecionadas) foram considerados para avaliar o desenvolvimento da tecnologia.

O status jurídico das patentes selecionadas foi analisado através das informações adicionais disponíveis na internet por meio das páginas dos escritórios que foram realizados os depósitos. Para coletar essas informações foram utilizados os sites do INPI (INPI, 2016), do European Patent Office (EPO, 2016) e do United States Patent and Trademark Office (USPTO, 2016), World Intellectual Property Organization (WIPO, 2016) e Das Deutsche Patent und Markenamt (DPMA, 2016). O termo utilizado para designar o status foi o mesmo apresentado pelo escritório.

4.2 Prospecção e análise de novas metodologias diagnósticas para as leishmanioses descritas na literatura

A revisão de literatura foi realizada a partir de levantamento bibliográfico sistematizado realizado na base de dados PubMed – U. S. National Library of Medicine. Títulos e resumos de artigos relacionados ao diagnóstico das leishmanioses publicados entre 01/01/2003 a 01/06/2015 foram analisados. Considerou-se novas metodologias de diagnóstico para as leishmanioses aquelas que não estão em comercialização e uso rotineiro ou que apresentavam melhorias sobre as utilizadas. A avaliação do desempenho do teste e sua fase de desenvolvimento foram consideradas para identificar artigos relevantes para essa revisão. Para otimizar a busca, optou-se por utilizar duas estratégias diferentes, uma voltada para LT e outra para LV, que continham termos Mesh específicos para cada apresentação clínica da doença. As estratégias utilizadas são apresentadas abaixo:

LT: ((((((Diagnosis[MeSH Terms]) OR Diagnosis[Text Word]) OR Diagnoses[Text Word]) OR (Diagnoses[Text Word] AND Examinations[Text Word])) OR (Examinations[Text Word] AND Diagnoses[Text Word])))))) AND (((((((((((((((((Leishmaniasis, Cutaneous[MeSH Terms]) OR Leishmaniasis, Mucocutaneous[MeSH Terms]) OR Leishmaniasis, Cutaneous[Text Word]) OR Leishmaniasis, Mucocutaneous[Text Word]) OR Cutaneous Leishmaniases[Text Word]) OR Cutaneous Leishmaniasis[Text Word]) OR Leishmaniases, Cutaneous[Text Word]) OR Oriental Sore[Text Word]) OR Sore, Oriental[Text Word]) OR Leishmaniasis, Old World[Text Word]) OR Old World Leishmaniasis[Text Word]) OR Leishmaniasis, New World[Text Word]) OR New World Leishmaniasis[Text Word]) OR Leishmaniasis, American[Text Word]) OR American Leishmaniasis[Text Word]) OR Leishmaniases, Mucocutaneous[Text Word]) OR Mucocutaneous Leishmaniases[Text Word]) OR Mucocutaneous Leishmaniasis[Text Word]

LV: ((((((((((Leishmaniasis, Visceral[MeSH Terms]) OR Visceral Leishmaniasis[Text Word]) OR Kala-Azar[Text Word]) OR Kala Azar[Text Word]) OR Black Fever[Text Word]) OR Fever, Black[Text Word])) OR (((Leishmaniasis[MeSH Terms]) OR Leishmaniasis[Text Word]) OR Leishmaniases[Text Word]))) OR ((((((((((Leishmania donovani[MeSH Terms]) OR Leishmania donovani[Text Word]) OR Leishmania donovanus[Text Word]) OR donovani, Leishmania[Text Word]) OR donovanus, Leishmania[Text Word]) OR Leishmania (Leishmania) donovani[Text Word]) OR Leishmania leishmania donovani[Text Word]) OR Leishmania leishmania donovanus[Text Word]) OR donovani, Leishmania leishmania[Text Word]) OR donovanus, Leishmania leishmania[Text Word]) OR leishmania donovani, Leishmania[Text Word]) OR leishmania donovanus, Leishmania[Text Word])) AND ((((Diagnosis[MeSH Terms]) OR Diagnosis[Text Word]) OR Diagnoses[Text Word]) OR (Diagnoses[Text Word] AND Examinations[Text Word])) OR (Examinations[Text Word] AND Diagnoses[Text Word])))

4.3 Estudo de caso do antígeno rK39

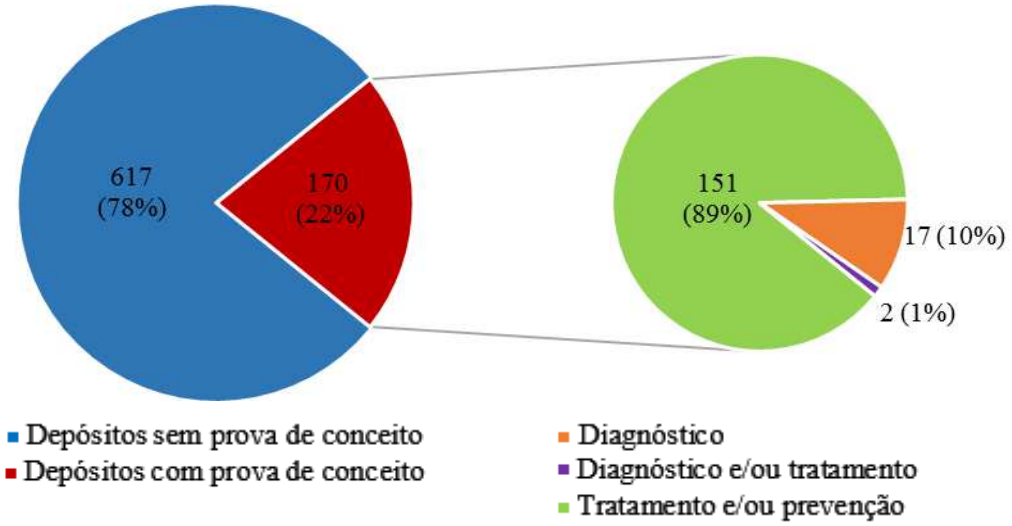
O estudo de caso do antígeno rK39 foi desenvolvido utilizando informações presentes em artigos científicos, incluindo publicações do presente grupo de pesquisa, documentos regulatórios, manuais do MS, patentes e informações pessoais. A primeira etapa do estudo consistiu na busca das informações e a segunda na análise crítica e argumentativa da cadeia produtiva do rK39, principal antígeno utilizado nos testes rápidos atualmente disponíveis comercialmente.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos depósitos de patentes relacionados ao diagnóstico das leishmanioses

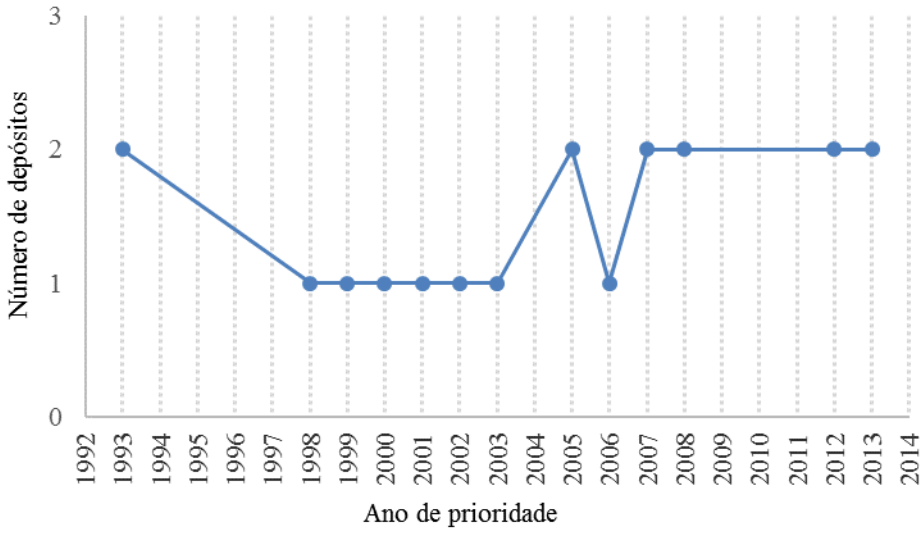
A busca sistematizada por patentes identificou 787 documentos. Destes, apenas 22% (170 patentes) apresentavam, em seu relatório descritivo, prova de conceito para diagnóstico e/ou tratamento das leishmanioses (Figura 1).

Figura 1. Estratificação por presença ou ausência de prova de conceito para as leishmanioses nas 787 patentes resgatadas na base de dados Thomson Innovation®, entre 01/01/2003 e 01/06/2015.



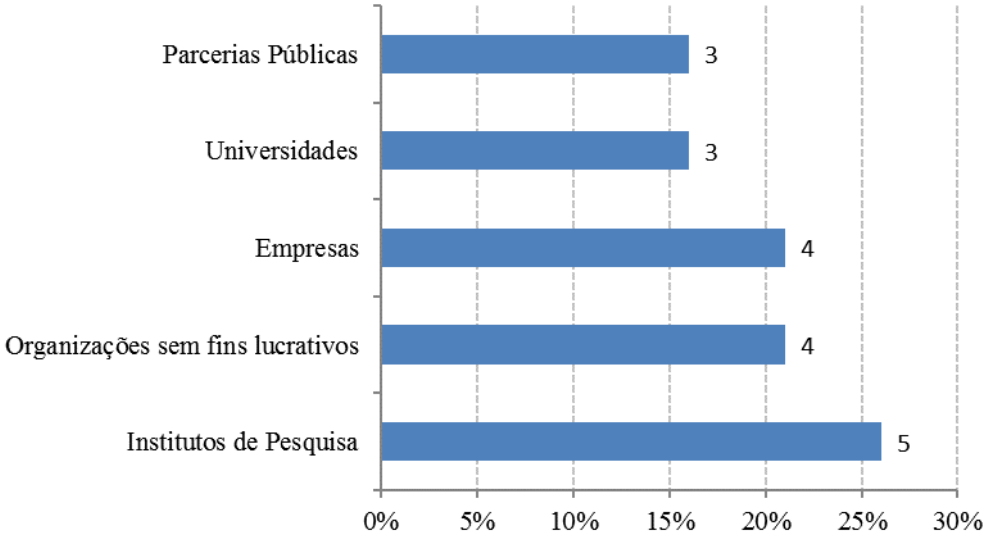
Entre as patentes com prova de conceito, 89% (151 documentos) reivindicaram proteção para tratamento e/ou prevenção, 10% (17 documentos) para diagnóstico e 1% (2 documentos) para ambos (Figura 1). A figura 2 apresenta a distribuição temporal dos depósitos prioritários.

Figura 2. Número anual de depósitos prioritários com prova de conceito das patentes relacionadas ao diagnóstico das leishmanioses, pesquisadas na base de dados Thomson Innovation®, entre 01/01/2003 e 01/06/2015.



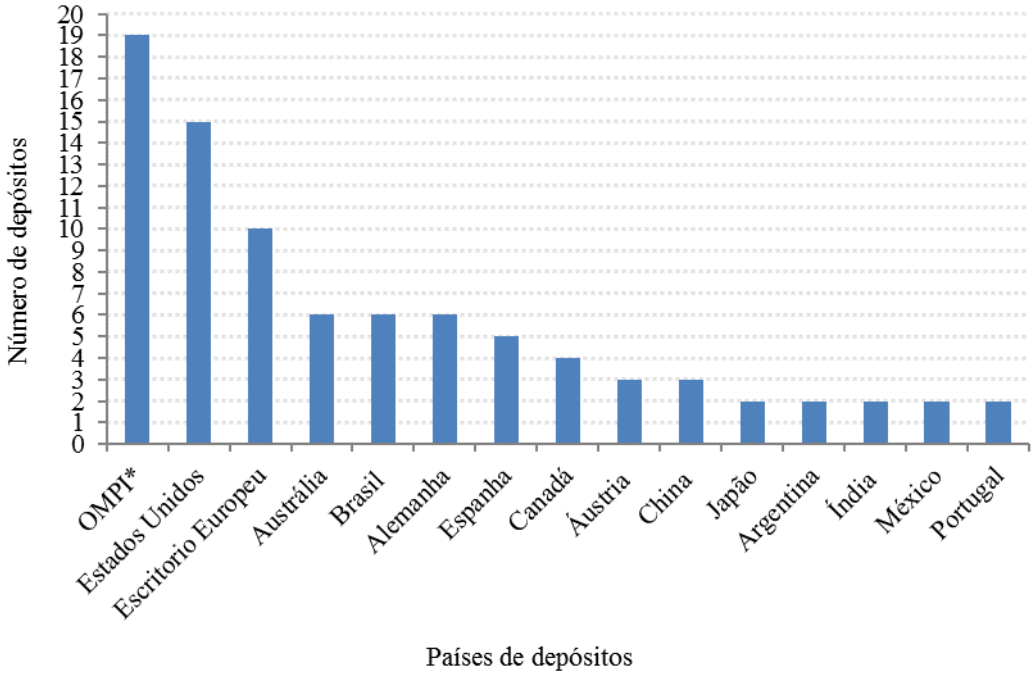
Entre os principais detentores das tecnologias, destacam-se os institutos de pesquisa com cinco depósitos (26%), seguidos pelas organizações sem fins lucrativos e empresas, com quatro depósitos (21%) e pelas universidades e parceria pública com três depósitos (16%) (Figura 3).

Figura 3. Categoria dos depositantes das 19 patentes relacionadas ao diagnóstico das leishmanioses, com prova de conceito, pesquisadas na base de dados Thomson Innovation® entre 01/01/2003 e 01/06/2015.



A OMPI, agência de Direito Internacional Público das Nações Unidas, com sede em Genebra, composta por 189 Estados membros recebeu o maior número de pedidos de patentes no período (19 depósitos), seguido pelo escritório de marcas e patentes dos Estados Unidos (United States Patent and Trademark Office - USPTO), com 15 depósitos e pela Organização Européia de Patentes, com 10 depósitos. O Brasil ocupou a quinta posição, com seis depósitos (Figura 04).

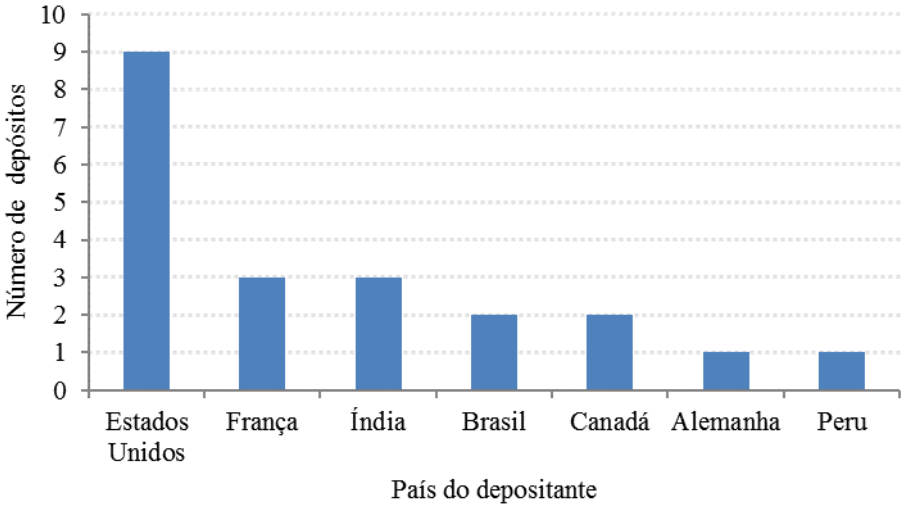
Figura 4. Distribuição dos 19 depósitos patentários com prova de conceito, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, por agências e países, de 01/01/2003 à 01/06/2015.



*Organização Mundial da Propriedade Intelectual

A figura 5 apresenta a distribuição dos depósitos por país de origem. O maior número de depósitos foi efetuado por instituições dos Estados Unidos (9), seguido pela França e Índia, com três depósitos. O Brasil realizou dois depósitos.

Figura 5. País de origem dos depositantes dos 19 depósitos patentários com prova de conceito, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, entre 01/01/2003 e 01/06/2015.



Nos pedidos de patentes relacionados ao diagnóstico identificou-se 16 instituições depositantes. Seis instituições depositaram dois pedidos: Infectious Disease Research Institute, Council of Scientific and Industrial Research, Fundação Oswaldo Cruz, InBios International Inc, Institut de recherche Pour le Developpement e U.S. Army medical Research and Materiel Command. As demais instituições realizaram apenas um depósito (Tabela 01).

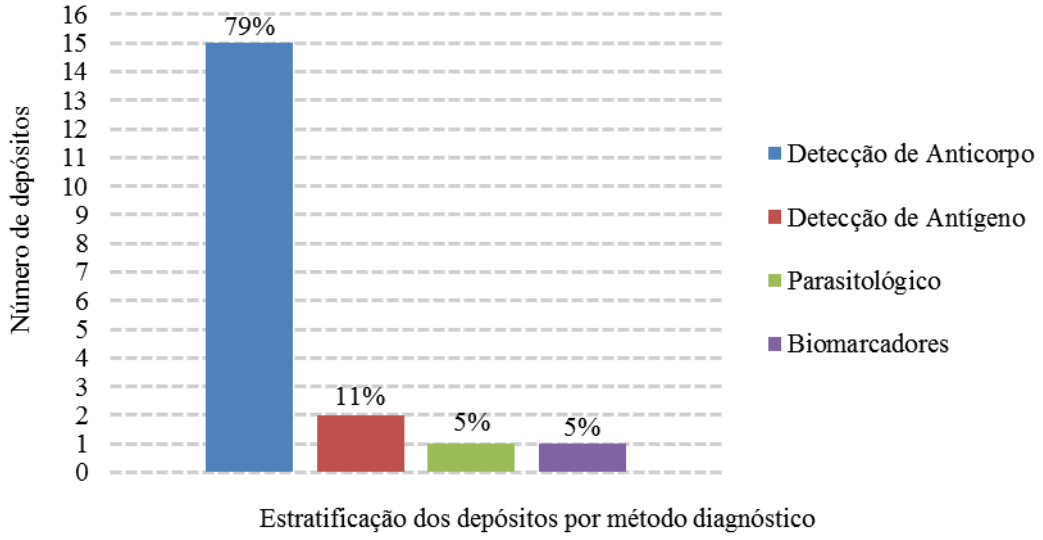
Tabela 1. Identificação das instituições depositantes e número de depósitos, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, entre 01/01/2003 e 01/06/2015.

Depositantes	Número de depósitos
Infectious Disease Research Institute, US	2
Council of Scientific and Industrial Research, IN	2
Fundação Oswaldo Cruz, BR	2
InBios International Inc.US	2
Institut de Recherche pour le Developpement, FR	2
U.S. Army Medical Research and Materiel Command, US	2
Institut Pasteur, FR	1
Corixa Corporation, US	1
All India Institute of Medical Sciences Division of Clinical Microbiology, IN	1
Department of Biotechnology Department of Govt of India, IN	1
Detectogen Inc., US	
Universidade Mcgill Montreal, CA	1
Universidade Philipps-Marburg, DE	1
The Government of the United States of America as Represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services, US	1
The Royal Institution for the Advancement of Learning Mcgill, CA	1
Universidade Peruana Cayetano Heredia, PE	1

Quinze documentos (79%) reivindicaram proteção somente para as leishmanioses e quatro (21%) reivindicaram para leishmanioses e outras doenças causadas por protozoários.

Entre os 19 depósitos, os métodos para detecção de anticorpos se destacaram com 15 (79%) depósitos, seguido pela detecção de antígenos com dois (28%), uma patente para parasitológico (5%) e uma patente para biomarcadores (5%) (Figura 06).

Figura 6. Estratificação das 19 patentes com prova de conceito para leishmanioses, durante o período compreendido entre 01/01/2003 à 01/06/2015, de acordo com o método diagnóstico.



Com relação ao status jurídico dos depósitos verificou-se que 10 (53%) depósitos foram abandonados, 05 (27%) depósitos tiveram o pedido de patente concedido, 02 (10%) depósitos têm status legal desconhecido e 02 (10%) depósitos estão ativos. O status e informações bibliográficas de todos os depósitos com prova de conceito para diagnóstico estão apresentadas na Tabela 02.

Tabela 2. Identificação, informações bibliográficas e status dos 19 depósitos com prova de conceito, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, entre 01/01/2003 e 01/06/2015.

Número de publicação	Título do depósito	Aplicação	Depositante	Data de publicação	Data do depósito prioritário	Status
P1-US20150057174A1	Differential diagnostic method and kit for infectious and parasitic diseases, using flow cytometry	Diagnóstico	Fundação Oswaldo Cruz, Brasil	2015	2012	Ativo
P2-US20150017200A1	Fusion proteins and their use in the diagnosis and treatment of leishmaniasis	Diagnóstico	Infectious Disease Research Institute, Estados Unidos	2015	2008	Concedido
P3-EP1681301B1	*Leishmania* antigens for use in the therapy and diagnosis of leishmaniasis	Diagnóstico	Corixa Corporation, Estados Unidos	2012	2000	Concedido
P4-US7740859B2	Polypeptides for the diagnosis and therapy of leishamaniasis	Diagnóstico	All India Institute of Medical Sciences Division of Clinicial Microbiology, Índia / Department of Biotechnology Department of Govt of India, Índia	2010	2003	Concedido
P5-US20150072354A1	Compounds and methods for diagnosis and treatment of leishmaniasis	Diagnóstico e tratamento	Infectious Disease Research Institute, Estados Unidos	2015	2006	Abandonado
P6-EP2085467B1	*Lutzomyia longipalpis* polypeptides and methods of use	Diagnóstico e tratamento	The Government of the United States of America as represented by the Secretary of the Department of Health and	2013	2002	Concedido

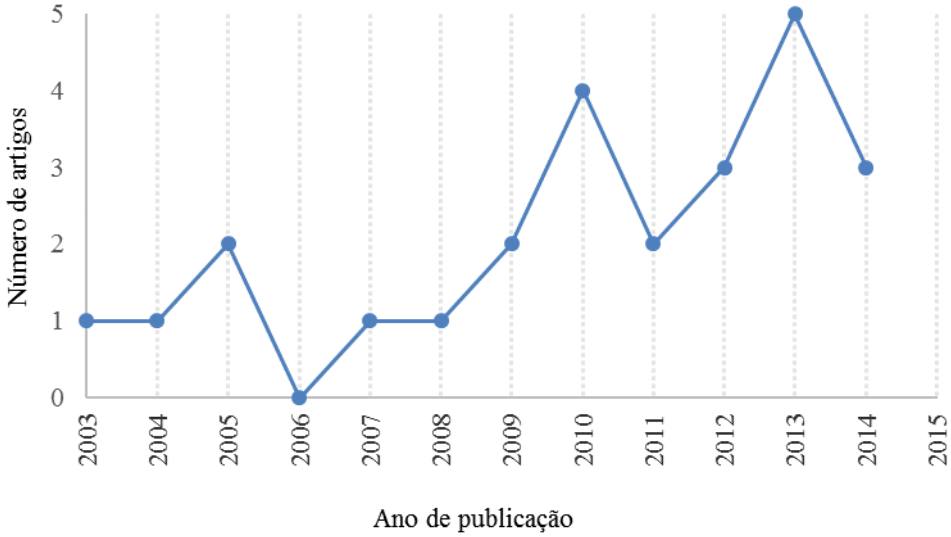
			Human Services, Estados Unidos / Fundação Oswaldo Cruz, Brasil			
P7-CA2162555C	Method for the culture in vitro of different stages of tissue parasites	Diagnóstico	Institut de Recherche pour le Developpement (IRD), França	2011	1993	Abandonado
P8-US8173383B2	Methods and materials for the detection of *Leishmania* infection	Diagnóstico	InBios International Inc., Estados Unidos	2012	2005	Concedido
P9-WO2015001383A1	Peptides and methods for the detection of leishmaniasis	Diagnóstico	Institut de Rrecherche pour le Developpement, França / Universidad Peruana Cayetano Heredia, Peru	2015	2013	Ativo
P10-US20130236484A1	Leishmaniasis antigen detection assays and vaccines	Diagnóstico	Detectogen Inc., Estados Unidos	2013	2012	Abandonado
P11-WO2009130709A2	A non-recombinant membrane antigen, a diagnostic kit thereof and process for detection of visceral leishmaniasis and PKDL	Diagnóstico	Council of Scientific & Industrial Research, Índia	2009	2008	Sem informação
P12-WO2014111207A1	Diagnosis of *Leishmania* infection	Diagnóstico	Philipps Universität Marburg, Alemanha	2014	2013	Abandonado
P13-US20100330585A1	Lateral flow assay system and methods for its use	Diagnóstico	InBios International Inc., Estados Unidos	2010	2007	Concedido

P14-DE69836020T2	Composition for the early diagnosis of visceral leishmaniasis, and process for its preparation	Diagnóstico	Council of Scientific and Industrial Research, Índia	2007	1998	Abandonado
P15-US20030072714A1	Microfluidized *Leishmania* lysate and methods of making and using thereof	Diagnóstico	U.S. Army Medical Research and Materiel Command, Estados Unidos	2003	2001	Abandonado
P16-WO2009059409A1	Biomarkers for visceral leishmaniasis	Diagnóstico	The Royal Institution For The Advancement of Learning Mcgill University,Canadá	2009	2007	Sem informação
P17-US7452721B2	Practical serological assay for the clinical diagnosis of leishmaniasis	Diagnóstico	The United States of America as represented by the Secretary of the Army,Washington, Estados Unidos	2008	1999	Abandonado
P18-DE69432417T2	Differentiell exprimierte *Leishmania* gene und proteinen	Diagnóstico	McGill University Montreal, Canadá	2004	1993	Abandonado
P19-US20060211056A1	*Leishmania* antigens suitable for a diagnostic kit of *Leishmania*	Diagnóstico	Pasteur Institut, França	2006	2005	Abandonado

5.2 Resultados da prospecção na literatura científica

A pesquisa por novos métodos de diagnóstico para LT identificou 1.538 artigos, dos quais 16 artigos foram selecionados pelo resumo para análise detalhada. Para o diagnóstico da LV, a busca identificou 4.126 artigos e 14 foram selecionados para análise. A descrição dos métodos diagnósticos identificados em publicações científicas está apresentada a seguir, estando as informações agrupadas por categoria do método diagnóstico (Tabela 3). Cabe ressaltar que 5 artigos foram resgatados tanto na busca para LT quanto para LV. A análise numérica e temporal dos 25 artigos incluídos na análise descritiva mostrou que o maior número de publicações ocorreu em 2013 (5) e 2010 (4) (Figura 7).

Figura 7. Número e ano de publicação dos artigos incluídos na análise descritiva, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, pesquisados na base de dados PubMed – U. S. National Library of Medicine, entre 01/01/2003 e 01/06/2015.



Entre os 25 artigos selecionados, as técnicas de diagnóstico por métodos moleculares se destacaram com 17 (68%) artigos, seguido pelos métodos parasitológicos com 5 (20%), 2 (8%) artigos para detecção de anticorpos e 1 (4%) para detecção de antígenos (Figura 08).

Figura 8. Estratificação dos artigos avaliando técnicas de diagnóstico para leishmanioses, durante o período compreendido entre 01/01/2003 à 01/06/2015.

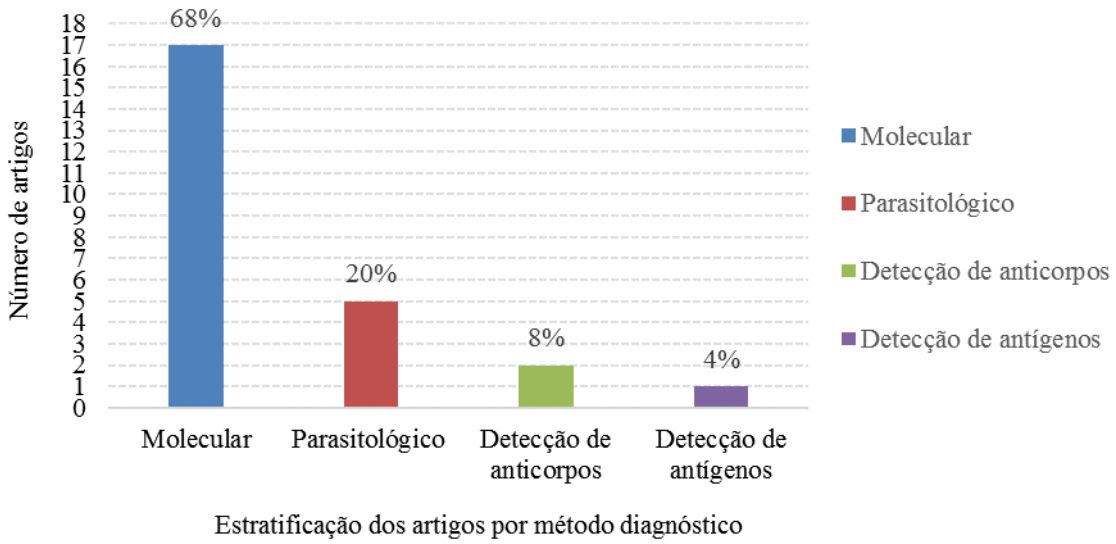


Tabela 3. Métodos diagnósticos identificados em artigos científicos pesquisados em bases de divulgação científica, relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, entre 2003 e 2015.

Método	Técnica	Artigo científico	Instituição (s) dos autores	País (s) de origem dos autores
Parasitológico	L1-Micro-cultura para isolamento de *Leishmania* de amostra de lesões	ALLAHVERDIYEV et al. (2004)	Tropical Diseases Research Centre, and Department of Dermatology, School of Medicine, Cukurova University	Turquia
		ALLAHVERDIYEV et al. (2005)	Tropical Diseases Research Centre, and Department of Dermatology, School of Medicine, Cukurova University	Turquia
	L2-Cultura de creme leucocitário e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com suspeita de LV	MAURYA et al. (2010)	Infectious Disease Research Laboratory, Department of Medicine, Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University	Índia
	L3-Hibridização *in situ* baseado na ligação específica de sondas marcadas por fluorescência para RNA ribossomal -FISH	FRICKMANN et al. (2012)	Department for Tropical Medicine at the Bernhard Nocht Institute, German Armed Forces Hospital Hamburg	Alemanha
	L4-Esfregaços de creme leucocitário de sangue periférico	SALAM et al. (2012)	Rajshahi Medical College	Bangladesh

Detecção de antígenos	L5-Imunossensores para detecção de antígenos	CABRAL-MIRANDA et al. (2014)	Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências da Biointeração	Brasil
Detecção de anticorpos	L6-CF para uso no diagnóstico da LT	ROCHA et al. (2003)	Laboratório de Doença de Changas do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ	Brasil
		DE OLIVEIRA et al. (2013)	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ,	
Molecular	L7-NASBA	VAN DER MEIDE et al. (2005)	Koninklijk Instituut voor de Tropen/Royal Tropical Institute	Holanda
		VAN DER MEIDE et al. (2008)	Koninklijk Instituut voor de Tropen/Royal Tropical Institute	Holanda
		BASIYE et al. (2010)	Centre for Clinical Research, Kenya Medical Research Institute	Quênia
		SAAD et al. (2010)	Department of Biochemistry, Khartoum University	Sudão
	L8-LAMP	TAKAGI et al. (2009)	Department of Parasitology, Aichi Medical University School of Medicine	Japão
		ADAMS et al. (2010)	Koninklijk Instituut voor de Tropen (KIT) Biomedical Research	Holanda
		KHAN et al. (2012)	International Centre for Diarrhoeal	Bangladesh

		Disease Research	
	VERMA et al. (2013)	National Institute of Pathology (ICMR), Safdarjung Hospital Campus	Índia
	MIKITA et al. (2014)	Division of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Department of Internal Medicine, National Defense Medical College,	Japão
L9-*Leishmania* Oligo-C Test para detecção de produto de PCR	ESPINOSA et al. (2009)	Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia	Peru
L10-Biossensores de DNA à base de óxido de níquel nanoestrutrurado para o diagnóstico de LV	MOHAN et al. (2011)	School of Materials Science and Technology, Institute of Technology	Índia
L11-PCR em tempo real	FOULET et al. (2007)	Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Henri Mondor	França
	WEIRATHER et al. (2011)	Iowa City VA Medical Center	Estados Unidos
	JARA et al. (2013)	Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia	Peru
	TOZ et al. (2013)	Ege University, Medical School	Turquia

		Department of Parasitology	
	TSUKAYAMA et al. (2013)	Department of Parasitology, U.S. Naval Medical Research Unit No. 6	Peru
	ADAMS et al. (2014)	Department of Parasitology, Royal Tropical Institute / Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas/ Foundation for Innovative New Diagnostics	Holanda Colômbia Suíça

5.3 Descrição dos métodos diagnósticos identificados por busca de depósitos patentários e artigos da literatura científica

5.3.1 Diagnóstico parasitológico

Depósito P7-CA2162555C - método de cultura

O Institut de Recherche pour le Developpement (IDR), da França, realizou em 1993 o depósito prioritário relacionado com o depósito resgatado pela busca com data de publicação de 2011, **CA2162555C,** que está relacionado à implementação de condições axênicas e livre de contaminantes celulares para cultivo de parasitos, incluindo diferentes espécies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis e L. panamensis)* e *T. cruzi*, através do uso de um meio de cultura de fase simples.

No relatório descritivo, foram apresentados resultados de testes *in vitro* e *in vivo* das formas amastigotas cultivadas em condições axênicas e a comprovação da sua infectividade. Posteriormente, os autores relatam a avaliação de exoantígenos de *L. infantum* cultivada nas condições descritas acima por ELISA. Neste documento, não foram descritos os dados do desempenho e nem as amostras utilizadas no ELISA, porém os inventores assumem que os resultados mostraram que os exoantígenos poderiam ser utilizados na detecção de anticorpos durante a infecção. Levando-se em consideração sua imunogenicidade, os autores ressaltam que os exoantígenos constituem ferramentas úteis para o diagnóstico das leishmanioses. Este depósito foi abandonado estudos relacionados com esta patente não foram identificados na literatura.

L1-Método de cultura microcapilar

O estudo realizado por Allahverdiyev et al (2004) apresentou um método sensível de cultura em microcapilar (MCM), desenvolvido para diagnóstico da LC. O método foi avaliado e comparado com o método de cultura tradicional (TCM) em tubos, utilizando amostras de lesões de 139 pacientes com suspeita de LC. A sensibilidade do TCM varia de acordo com tipos de lesões, cepas do parasito, número de amastigotas em amostras e localidades, mesmo dentro de uma região. Segundo os autores, o MCM é muito menos suscetível a estes parâmetros e proporciona uma leitura mais rápida. Nesse estudo, a sensibilidade do MCM foi de 93,6%, enquanto a sensibilidade para o TCM foi de 35,7%. Os autores justificam que a elevada sensibilidade do MCM pode ser explicada pela utilização de tubos capilares, que

concentram o material da amostra proporcionando condições microaerófilas favoráveis para a transformação de formas amastigotas em promastigotas. Embora o novo método tenha mostrado desempenho superior ao método tradicional, os autores ressaltam a necessidade de uma avaliação mais aprofundada para a aplicação do MCM no diagnóstico de LC em áreas endêmicas.

O método de microcultura foi também desenvolvido e avaliado para o diagnóstico da LV por Allahverdiyev et al. (2005). Amostras de aspirado de medula e sangue periférico foram coletadas de 25 crianças com suspeita de LV. Os resultados apontam que o MCM foi mais sensível do que o TCM e que o período de tempo médio de incubação para detectar promastigotas foi muito mais curto do que o do TCM, sendo de 2 a 7 dias para MCM, e de 4 a 35 dias para TCM. A sensibilidade para MCM em aspirado medula óssea foi de 100%, e em sangue periférico variou de 77,8 a 100%.

L2-Cultura de creme leucocitário em placas de microtitulação

Maurya et al (2010) desenvolveram um método de cultura em placas de microtitulação com diluição seriada, para isolar e detectar *Leishmania* em amostras de creme leucocitário e células mononucleares do sangue periférico. Sessenta e oito casos de LV confirmados por microscopia foram avaliados, com sensibilidade para detecção de parasitos em creme leucocitário de 85% e para células mononucleares de 91,5%. Ao comparar o tempo para a detecção do parasito, percebeu-se que em culturas com amostras diluídas, a detecção foi mais rápida do que em amostras não diluídas. A partir desses resultados, os autores concluíram que a diluição das amostras pode facilitar a detecção de parasitos e a substituição dos tubos de ágar tradicionais por placas pode ser vantajosa em vários aspectos, pois consome menos meio e o uso de placas de microtitulação permitem o monitoramento durante o crescimento da cultura, consequentemente reduzindo o tempo de detecção.

L3-Hibridização *in situ* – FISH

Esta técnica abrange um novo método de hibridização *in situ* para detecção de microrganismos em amostras biológicas, incluindo *Leishmania,* baseado na ligação específica de sondas marcadas por fluorescência para RNA ribossomal (FISH). A hibridização *in situ* tem sido amplamente empregada para a identificação de vários microrganismos em amostras clínicas, por microscopia de fluorescência (HOGARDT et al. 2000; KEMPF et al. 2000;

POPPERT et al. 2002; POPPERT et al., 2005, 2010a, b; WELLINGHAUSEN et al. 2005). Um estudo padronizou e avaliou a técnica de FISH (protocolo para *Leishmania* spp.) para triagem em amostras de pele conservadas em parafina provenientes de pacientes com LC da Síria, relatando 94% de concordância com o exame direto (coloração por Giemsa) (FRICKMANN et al., 2012). O estudo limitou-se à etapa de prova de conceito, não tendo sido avaliados os parâmetros de sensibilidade e especificidade.

Um depósito relacionado a esta técnica foi realizado pela Science & Technology Corpe dos Estados Unidos e Universidade New México (WO2000065093A2). O depósito não foi resgatado pela estratégia de busca de patentes, pois foi publicado antes do período da busca, mas foi encontrado pela busca com palavras-chave da técnica, identificada pela busca de literatura. No relatório descritivo foi apresentada a metodologia do experimento com amostras de cultura de *L. donovani*, porém os dados de desempenho do teste não foram relatados.

L4-Esfregaço de creme leucocitário

Outra alternativa, utilizando o creme leucocitário como amostra para o diagnóstico de LV, foi apresentada por Salam et al (2012). Este estudo avaliou o uso de esfregaços de creme leucocitário de sangue periférico por miscroscopia, comparando com a PCR de creme leucocitário para detecção de DNA de *L. donovani*. Amostras de creme leucocitário obtidas com solução Histopaque (Histopaque-1119, Sigma-Aldrich) foram coletadas de 112 pacientes com LV de área endêmica em Bangladesh. O esfregaço e a PCR de creme leucocitário apresentaram sensibilidade de 92% e 95,5%, respectivamente. Assim, os autores afirmam que o esfregaço de creme leucocitário é uma ferramenta promissora e menos invasiva para o diagnóstico da LV. No entanto, ressaltam que sua sensibilidade e especificidade devem ser validadas por um estudo mais aprofundado para avaliação do diagnóstico em campo.

5.3.2 Métodos baseados em detecção de antígenos

Depósito P8-US8173383B2 – detecção de Tiol specific antigen-TSA de *L. major*

Com foco no diagnóstico da LC, o depósito US8173383B2, depositado pela InBios International Inc, dos Estados Unidos, em 2005 e posteriormente licenciado pelo US Army conforme informações do depósito US20090317841 (HOUGHTON RL, 2009), refere-se a

ensaios diagnósticos rápidos que possam ser facilmente utilizados em campo, reduzindo o tempo entre o diagnóstico e o tratamento da doença. Estes incluem ensaios imunoenzimáticos e imunocromatografia de fluxo lateral empregados na detecção do antígeno específico-tiol (Tiol specific antigen - TSA) de *L. major* também conhecido como peroxidoxin, detectável em escarificações, biópsias e aspirados de lesões.

No relatório descritivo da patente, é relatada a preparação de anticorpos monoclonais e policlonais contra antígenos presentes em amastigotas de *Leishmania* spp. Hibridomas para produção de anticorpos contra antígenos de amastigotas, detectáveis por ELISA, foram identificados; entre estes, o anticorpo monoclonal C11C e o anticorpo policlonal anti-TSA. Os sobrenadantes de quatro hibridomas produtores de anticorpos monoclonais foram testados contra TSA e contra uma proteína de *T. cruzi*, como controle negativo. O anticorpo monoclonal conhecido como WIC79.3 também foi avaliado.

Os anticorpos C11C e anti-TSA foram analisados quanto a sua reatividade contra preparações de promastigotas de *L. major* crescidas em cultura, assim como amastigotas provenientes de lesões de camundongos. Os anticorpos mostraram forte reatividade contra promastigotas e amastigotas na avaliação por ELISA, porém não foram apresentados os dados de desempenho. Foram também desenvolvidos um método ELISA sanduíche e um imunoensaio de fluxo lateral. Estas duas técnicas utilizaram o anticorpo monoclonal WIC 79.3, relatado como específico para LPG de *L. major*. Neste ensaio, verificou-se que o anticorpo WIC 79.3 foi capaz de detectar exoantígeno de *L. major* e, portanto, os inventores destacam o potencial de aplicação desse reagente para a identificação específica de antígenos em amostras obtidas a partir de lesões cutâneas. Ao final, os autores ressaltam a possibilidade de que várias alterações ainda possam ser realizadas, sem desvio do escopo da invenção.

A partir desta tecnologia foi desenvolvido pela InBios International Inc dos Estados Unidos, o teste rápido CL Detect™, um teste qualitativo para uso *in vitro* baseado em ensaio imunocromatográfico para a detecção de antígenos de espécies de *Leishmania* em lesões da pele de pacientes com LC. O desempenho do teste foi avaliado por ensaio clínico e apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 90,95% (CLINCAL TRIALS, 2015). A performance do teste foi avaliada em duas regiões endêmicas de LC em 149 amostras de lesões de pele de pacientes suspeitos com LC com resultado de microscopia positiva e 19 amostras de lesões de pele de pacientes suspeitos para LC com resultado negativo na microscopia. Nesse estudo a sensibilidade do teste foi de 100% e a especificidade de 84,2%. Em um estudo clínico prospectivo em uma aréa não endêmica para LC dos Estados Unidos foram avaliadas por CL Detect™ e por microscopia um total de 150 amostras de pacientes

com lesões de pele que tinha uma apresentação clínica semelhante a LC. Todas as 150 amostras foram negativas para CL por microscopia e CL Detect™ apresentou especificidade de 96% (FDA, 2014). O teste ainda não foi avaliado em estudo de fase III, além do mais, não possui registro na ANVISA e nem estudos de validação no Brasil.

Várias publicações subsequentes à patente relacionam-se ao desenvolvimento de vacinas utilizando TSA para induzir resposta imune (CAMPOS et al., 2001; CAMPOS et al., 2002; TABATABAIE et al., 2014).

Depósito P10-US20130236484A1 – detecção de peptídeos antigênicos na urina de portadores de LV

O depósito US20130236484A1 realizado em 2012, pela Detectogen Inc, dos Estados Unidos, refere-se à descoberta de peptídeos antigênicos de *L. infantum* ou *L. donovani,* que permitem o diagnóstico da LV em amostra de urina e o efeito imunogênico destes quando administrados em composições para estimular resposta imunológica específica para LV. No documento é apresentado o isolamento de três proteínas produzidas por indivíduos portadores da LV, que são excretadas na urina durante a infecção.

Inicialmente, amostras de urina de pacientes com diagnóstico de LV foram avaliadas por espectrometria de massa (EM), gerando aproximadamente 400 sequências de peptídeos. A maioria dessas sequências tinha homologia com sequências de proteínas humanas e apenas oito apresentavam homologia para três diferentes proteínas de *L. infantum*: dois peptídeos (LNAAAESNSGLASK (Seq: 2) e GGGEPSGPLASAIVDSFGSFASFK (Seq: 4)) tinham correspondência com a sequência da proteína ferro superóxido dismutase (Li-isd1), quatro peptídeos (QNDMVDMSSLSG (Seq: 6), MPWLSIPFEK (Seq: 8), QYKVESIPTLIGLNADTGDTVTTR (Seq: 10), e VESIPTLIGLNADTGDTVTTR (Seq: 12) tinham correspondência com a sequência da triparedoxina (Li-txn1) e dois (FANLGFTEAAFK (Seq: 14) e EQVQGVDAIMAR (Seq: 16)) tinham correspondência com a proteína putativa fator nuclear de transportes 2 de *L. infantum* (Li-NTf2).

Os genes que codificam estas proteínas foram clonados e as moléculas recombinantes foram produzidas em *Escherichia coli.* Anticorpos contra essas proteínas foram produzidos em coelhos e galinhas e usados no desenvolvimento de um ELISA de captura, para detectar estes antígenos na urina dos pacientes. Usando urina de 20 pacientes diagnosticados com LV, cada proteína (Li-isd1, Li-txn1 e Li-NTf2) foi detectada em cerca de 10-12 amostras testadas pelo ELISA de captura, que apresentou sensibilidade de 89% e especificidade de 100%.

Nenhum dos antígenos foi detectado em amostras de urina de 62 pacientes com LC, doença de Chagas, esquistossomose e tuberculose. Quando se realizou o ensaio combinado com os três antígenos em 20 amostras de urina de pacientes com LV, 20 amostras de indivíduos saudáveis e 42 amostras de outras doenças (leishmaniose cutânea, doença de Chagas, esquistossomose e tuberculose), o teste apresentou sensibilidade e especificidade de 100%. Este depósito foi abandonado.

Abeijon et al. (2012) publicaram um ensaio de detecção das três proteínas desta patente (Li-isd1, Li-txn1, e Li-NTf2) em amostras de urina, por ELISA, com amostras semelhantes às descritas na patente: 19 amostras de urina de pacientes com exames parasitológicos positivos para LV, 16 amostras de urina de indivíduos saudáveis e 42 amostras de pacientes com outras doenças parasitárias. O ensaio mostrou sensibilidade de 89,5% e especificidade de 100%. Estes resultados são representativos de pelo menos três ensaios realizados em momentos diferentes com as mesmas amostras de urina por ELISA de captura. Nenhuma reação cruzada foi observada com amostras de urina de pacientes com LC, doença de Chagas, esquistossomose, ou tuberculose, apontando para alta especificidade. A partir desses resultados, os autores concluíram que esses antígenos são potentes candidatos para o diagnóstico da LV. Um estudo publicado por Kashino et al. (2012) mostrou a aplicação desses antígenos como candidatos à produção de uma vacina para LV.

L5-Detecção de antígenos de *Leishmania infantum* por imunosensor

Esta abordagem baseia-se no uso de imunossensor capaz de detectar antígenos de *L. infantum* em tecidos de hospedeiros infectados. Anticorpos monoclonais contra *L. infantum* foram imobilizados em uma superfície de ouro, coberta com uma fina camada de 2-aminoetanotiol e glutaraldeído, bloqueada com glicina, e colocada em contato com extratos de baço de hamsters infectados e não-infectados por *L. infantum*. Segundo os autores, os resultados iniciais (detecção de 1,8 x 10^4 amastigotas/grama de tecido infectado) demonstraram o potencial diagnóstico deste método para LV, embora haja necessidade de melhoria em sua sensibilidade (CABRAL-MIRANDA et al., 2014). Patentes relacionadas com esta tecnologia não foram encontradas.

5.3.3 Métodos baseados em detecção de anticorpos

Depósito P1-US20150057174A1 – detecção de anticorpos em Triplex por citometria de fluxo

O depósito US20150057174A1 solicitado pela Fundação Oswaldo Cruz do Brasil, em 2012, refere-se à invenção "Método Triplex (FC-Triplex-IgGl". Trata-se de imunofluorescência realizada por citometria de fluxo (CF), que utiliza epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. chagasi*, *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* fixadas e coradas com concentrações graduais de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (FL-1) ou do fluorocromo Alexa Fluor 647 (FL-4) para pesquisa simultânea de anticorpos IgG1 contra estes parasitos.

No documento, os autores relatam o alto desempenho do método para diagnóstico diferencial de pacientes portadores de LV, LC e doença de Chagas. Em uma primeira avaliação do FC-Triplex-IgGl com concentrações graduais de FL-1 e revelação com IgG1 anti-tripanossomatídios com FL-4 em 77 pacientes, o método apresentou 96,1% de sensibilidade e, em uma segunda avaliação, em 76 amostras, 94,7%. Este pedido de depósito encontra-se ativo.

Teixeira-Carvalho et al. (2015) apresentaram a detecção simultânea de anticorpos IgG1 anti-*L. infantum,* anti-*T. cruzi* e anti-*L. braziliensis*, usando coloração diferencial dos parasitos com FITC ou Alexa Fluor 647, em uma única plataforma de citometria de fluxo. O método IgG1 FC-TRIPLEX Chagas/Leish usa o percentual de parasitos com fluorescência positiva como um indicador de soro positivo, a partir dos valores de corte pré-determinados. Oitenta amostras de soro humano foram divididas em quatro grupos e avaliadas pelo método IgG1 FC-TRIPLEX: 1) 20 amostras de doadores de sangue saudáveis; 2) 20 amostras de pacientes portadores de doença de Chagas; 3) 20 amostras de pacientes com LC e 4) 20 amostras de pacientes com LV. Os resultados obtidos com um número limitado de amostras de soro bem definidas mostraram 100% de sensibilidade para pacientes com LV e 95% de sensibilidade para pacientes com doença de Chagas e pacientes com LC. Nos resultados não foram apresentados os valores de especificidade. O método IgG1 FC-TRIPLEX Chagas/Leish forneceu resultados corretos para 76 das 80 amostras avaliadas, apresentando precisão global de 95%. Os autores salientam que o método é uma valiosa alternativa para diferenciar portadores de doença de Chagas, LV ou LC e que o método pode esclarecer os resultados inconclusivos ou falso-positivos, que são frequentemente observados em testes convencionais.

L6-Citometria de fluxo

Rocha et al. (2003) descrevem a padronização da CF e sua aplicabilidade na detecção de anticorpos antipromastigotas vivas de *L. braziliensis*. A padronização da técnica baseou-se na avaliação do *pool* de sete amostras de soros provenientes de pacientes com LT portadores de lesão ativa, com RIFI e intradermorreação de Montenegro positivas; *pool* de 10 amostras de soros de indivíduos saudáveis provenientes de área não endêmica e amostras de 10 de indivíduos provenientes de área endêmica para LT, mas, que apresentavam RIFI negativa.

Após a padronização da técnica, o método foi testado com 39 amostras de pacientes com LT (18 pacientes com RIFI positiva e ausência de lesão, e 21 pacientes apresentando RIFI positiva e presença de lesão) e 10 amostras de indivíduos saudáveis com RIFI negativa. A diluição de 1:1.024 permitiu distinguir 95% dos pacientes com presença de lesão (percentual de parasitos fluorescentes positivos > 50%) e 72% dos pacientes com ausência de lesão (percentual de parasitos fluorescentes positivos < 50%). Em síntese, os autores concluem que os resultados sugerem a aplicabilidade da citometria de fluxo para identificação dos casos com infecção ativa, o que não tem sido possível através das reações sorológicas convencionais.

Oliveira et al. (2013) compararam as técnicas RIFI e CF para avaliação clínica e laboratorial dos pacientes antes e após a cura clínica e avaliaram a aplicabilidade da CF no acompanhamento pós-terapêutico de pacientes com LTA. Os pacientes foram classificados de acordo com a presença de LTA antes do tratamento e ausência de LTA após 1, 2 e 5 anos do tratamento. Na análise, foram incluídos: 1) Soros de 14 pacientes coletados antes do tratamento, de 13 pacientes coletados um ano após o tratamento e de 10 pacientes coletados dois e cinco anos pós-tratamento, e, 2) 8 soros de doadores de sangue saudáveis. A maioria dos pacientes tinha lesões ulceradas com bordas elevadas e fundo granulomatoso distribuídos em áreas descobertas do corpo. Apenas um paciente apresentou a forma cutânea disseminada, com mais de 20 lesões papulosas e um outro paciente tinha a forma mucocutânea.

Ao analisar as curvas de titulação de anticorpos, percebeu-se que a diluição 1:256 a 1:2048 é ideal para avaliar os indivíduos pós tratamento por CF. Nestas condições, com soro diluído 1:256, a CF mostrou especificidade de 77%, após um ano de tratamento, 80% após dois anos de tratamento foi e 70%, cinco anos após o tratamento. A RIFI apresentou sensibilidade de 92,86%. A especificidade em pacientes após um ano de tratamento foi de 38,5%, dois anos após tratamento foi de 30% e após cinco anos, foi de 50%.

A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que a CF se mostra uma nova alternativa para diagnóstico. Segundo os autores, visto que os testes sorológicos convencionais não fazem distinção entre infecção ativa e passada, a CF abre perspectiva para monitorar a cura pós-tratamento de LTA, pois mostrou diminuição da percentagem de positivos, após tratamento.

Depósito P2-US20150017200A1 – antígeno recombinante sintético K28 para diagnóstico de LV

A tecnologia apresentada no depósito **US20150017200A1** pelo Infectious Disease Research Institute/Estados Unidos, em 2008, refere-se à fusão de polipeptídeos antigênicos isolados de *L. donovani*, a serem utilizados no diagnóstico da LV humana e canina. Esta fusão compreendeu associações entre os antígenos K26, K39 e K9 ou de suas porções imunogênicas. No relatório descritivo é apresentada a construção de um gene sintético, denominado K28, contendo sequências parciais de DNA dos antígenos K26 e K39 e a sequência completa do K9. O objetivo da fusão foi aumentar o potencial de diagnóstico na construção de uma única proteína e oferecer aumento da sensibilidade do teste e custos reduzidos em termos de produção de uma única proteína.

O documento descreve sensibilidade de 94% para o rK28, em plataforma de ELISA, usando soros de 52 pacientes venezuelanos com sinais clínicos e exames sorológicos positivos (RIFI, hemaglutinação indireta ou ELISA) para LV. A avaliação dos antígenos rK28 e rK39 em uma plataforma imunocromatográfica dupla, utilizando 69 amostras de portadores de LV também é apresentada e comparada ao DAT. Nesta descrição, o rK28 mostrou-se mais sensível do que o rK39, com 95,6% de sensibilidade e 88,4%, respectivamente. Além disso, quatro amostras de pacientes com LV com títulos muito baixos no DAT (<3200) foram corretamente identificados pelo teste rápido rK28, enquanto apenas dois dos quatro foram corretamente identificados pelo teste rápido rK39. A patente para este depósito foi concedida.

Pattabhi et al (2010) realizaram um estudo para comparar o desempenho do rK39 com a nova poliproteína sintética, rK28, em áreas que o rK39 apresenta menor sensibilidade, seguido pelo desenvolvimento e avaliação de protótipos de duas novas plataformas de teste rápido, sendo uma por fluxo lateral (K28-FL TDR) e outra por duplo percurso (DPP) (rK28-DPP TDR). O DPP difere do FL, em que a amostra teste e o conjugado de detecção de anticorpo são adicionados à área da linha de teste independente um do outro, utilizando duas tiras laminadas ligadas entre si como um "T" dentro de um cassete de plástico descartável. A

primeira tira recebe a amostra de soro e o tampão de corrida e a segunda tira apresenta as linhas teste (T) e controle (C). Ao comparar 13 soros de LV de pacientes sudaneses que apresentaram baixa reatividade para rK39, confirmou-se maior sensibilidade (92%) para o teste com rK28 em comparação com o teste Kalazar Detect™ (69%).

O antígeno rK28, clonado e purificado por Pattabhi et al. (2010), foi posteriormente fornecido para as empresas EASE-Medtrend (Shanghai, China) e Chembio Diagnostic Systems (Medford, NY), que produziram dois testes rápidos, nomeados K28 LF e K28 DPP, respectivamente. O desempenho destes dois testes, avaliados em pacientes do Sudão e Bangladesh, foi comparado ao apresentado pelo teste rápido Kalazar Detect™. A sensibilidade e especificidade do K28 LF, K28 DPP e Kalazar Detect™, em amostras de soros de pacientes portadores de LV, confirmados por exames parasitológicos e controles endêmicos saudáveis, foram estimadas em 98,1 e 92,5%; 95,9 e 100%; 88,7 e 100%, respectivamente. Os autores ressaltaram que o antígeno rK28 apresentou melhor desempenho que o rK39, mostrando-se promissor para uso no diagnóstico rápido da LV.

Na Índia, Vaish et al (2012) avaliaram a acurácia do ELISA rK28 comparada ao ELISA rK39. Foram incluídos no estudo 252 pacientes portadores de LV, confirmados parasitologicamente, 103 indivíduos controles saudáveis de área endêmica , 95 indivíduos controles saudáveis de área não endêmica, 88 pacientes portadores de outras doenças infecciosas e 53 casos monitorados após seis meses de tratamento. A sensibilidade do ELISA foi estimada em 99,6%, independente do antígeno utilizado. Já a especificidade variou de 85 a 95% no ELISA rK39 e 84 a 97% no ELISA rK28. Os autores concluíram que o rK28 apresenta desempenho semelhante ao rK39, representando uma ferramenta adicional ao arsenal diagnóstico disponível para LV.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade dos testes rápidos na detecção de casos de LV na África, Bezuneh et al. (2014) avaliaram o uso do rK28 em quatro protótipos de testes imunocromatográficos (DPP, CTK, EMT, InBios^{+}) na Etiópia e no Sudão. A primeira avaliação do estudo foi realizada na Etiópia comparando o desempenho de três testes rK28 (DPP, EMT, InBios^{+}) com o DAT e dois testes rápidos rK39 (IT LEISH® e Kalazar Detect™), utilizando amostras de soro obtidas de 95 pacientes com LV confirmados por método parasitológico (82 pacientes com LV e 13 pacientes coinfectados HIV/LV) e 111 amostras de soro negativas para LV, incluindo indivíduos saudáveis de regiões não endêmicas de LV, indivíduos saudáveis de regiões endêmica para LV e pacientes com outras doenças infecciosas. De acordo com os autores, os resultados mostraram que os três testes com rK28 apresentaram modesto aumento na sensibilidade (95,8-98,9%), quando comparados com DAT

(91,6%), Kalazar Detect™ (92,6%) e IT LEISH® (96,8%). A especificidade dos testes com rK28 variou de 80,2 a 94,6%. Enquanto, a especificidade do DAT foi de 97,3% e do Kalazar Detect™ e IT LEISH® de 98,2% para ambos.

A segunda avaliação realizada na Etiópia incluiu amostras de soro de 100 pacientes com LV, 94 pacientes com outras doenças infecciosas e 50 indivíduos saudáveis de regiões não endémicas de LV. Nesta análise, os autores compararam o desempenho dos quatro protótipos rK28 (DPP, CTK, EMT, InBios^{+}) com o DAT. A sensibilidade dos testes com rK28 variou de 96 a 99% e a especificidade de 94 a 100%. Nesse estudo o DAT apresentou sensibilidade e especificidade de 95,9 e 100%, respectivamente. A terceira avaliação deste estudo comparou os quatro protótipos rK28 (DPP, CTK, EMT, InBios^{+}) com o DAT e foi realizada no Sudão em 100 amostras de soro de pacientes com LV, 75 amostras de soro de pacientes com outras doenças infecciosas, 50 amostras de indivíduos sudanêses de regiões não endêmicas e 25 amostras de indivíduos sudanêses de regiões endêmicas. A sensibilidade dos testes com rK28 variou de 94 a 97% e a especificidade dos mesmos de 91,3 a 99,3%. À medida que, o DAT mostrou sensibilidade de 95% e especificidade de 100% para as mesmas amostras.

No Sudão foi também avaliado o desempenho dos testes com rK28 entre amostras de soro e sangue total. Vinte e cinco amostras de pacientes confirmados com LV e 20 amostras de pacientes foram comparadas. A partir dos resultados, observou-se concordância de 100% no desempenho do teste (sensibilidade, especificidade) entre as amostras de soro e sangue total.

Em estudo prospectivo realizado no Sudão, Mukhtar et al. (2015) validaram um teste rápido padronizado com o antígeno rK28 em sangue e soro, para o diagnóstico da LV humana. Nesta avaliação foram incluídos 200 casos de LV e 85 controles, categorizados de acordo com o resultado do exame parasitológico. As sensibilidades e especificidades do teste em sangue e soro foram: 92,5% e 94,5%; 100% e 97,6%, respectivamente. Os autores ressaltaram que a disponibilização de um teste rápido com alto desempenho em sangue e soro será muito útil na África.

Esses dados reforçam o potencial desta tecnologia para o diagnóstico da LV. No Brasil há registro na ANVISA de um teste rápido que já utiliza o antígeno, OL Leishmaniose Visceral Humana, produzido pela Orangelfe Comércio e Indústria Ltda/Brasil, porém o kit não está disponível comercialmente e não há nenhum estudo de validação no país. A empresa apenas divulga em seu portfólio que o produto estará disponível em breve.

Depósito P3-EP1681301B1 – antígenos de *Leishmania*

A Corixa Corporation dos Estados Unidos, em 2000, realizou o depósito prioritário do depósito EP1681301B1 publicado em 2012**,** que se refere a proteínas de fusão para prevenir, detectar e tratar leishmanioses, bem como para estimulação de resposta imune. Os polipeptídeos descritos incluem moléculas que contém porções imunogênicas de antígenos de *Leishmania* spp., tais como: M15, Ldp23, Lbhsp83, Lt-210, LbelF4A, Lmsp1a, Lmsp9a, MAPS-1A. Inicialmente, os inventores descrevem a clonagem, expressão e purificação dos antígenos para serem utilizados em testes *in vivo*. A reatividade de MAPS-1A foi testada por ELISA com 96 amostras de pacientes com LV, 27 amostras de pacientes com LC e oito amostras de soro de indivíduos saudáveis. Além da avaliação em humanos, o ELISA também foi realizado em soros de camundongos infectados com *L. major*. Aproximadamente 50% das amostras provenientes de pacientes com LV e LC mostraram reatividade com o MAPS-1A. Este depósito foi abandonado.

A busca na literatura científica resgatou dois estudos que avaliaram o potencial dos antígenos Ldp23 e Lbhsp83, porém, os trabalhos são relacionados com a capacidade desses antígenos induzirem resposta imunológica (CAMPOS-NETO et al., 1995; SKEIKY et al., 1995).

Depósito P4-US7740859B2 – antígenos recombinantes DD8 e KE16

A invenção relatada em 2003 no depósito **US7740859B2** pelo All India Institute of Medical Sciences Division of Clinicial Microbiology e Department of Biotechnology Department of Govt of India descreve antígenos recombinantes desenvolvidos a partir de isolados de *L. donovani***.** Na invenção, verificou-se que a sequência do antígeno cinesina difere da publicada de *L. chagasi* (BURNS et al. 1993), que derivou o rK39. Duas proteínas recombinantes foram descritas na invenção, rDD8 e rKE16, codificadas pelo gene cinesina das cepas indianas de *L. donovani* MHOM/IN/DD8 e MHOM/IN/KE16/1998, respectivamente.

Para estudar a antigenicidade das proteínas purificadas, foi realizado um Western Blotting (WB) com 10 amostras de soros de pacientes com LV, 10 com leishmaniose dérmica pós-kala-azar (PKDL) e cinco de indivíduos saudáveis. Os resultados da WB revelaram que os antígenos recombinantes de *L. donovani* são específicos, apesar de terem

epítopos diferentes. Não foram relatados os valores de sensibilidade e especificidade apresentados no ensaio de WB.

Os antígenos rDD8 e rKE16 foram também avaliados por ELISA com 72 soros de indivíduos saudáveis de áreas endêmicas, 80 controles saudáveis de áreas não endêmicas, 92 pacientes com tuberculose, 32 com HIV, 31 com HCV e 27 indivíduos com HBsAg positivo. Os níveis de anticorpos para a proteína rDD8 foram consideravelmente inferiores aos apresentados pela proteína rKE16 na mesma amostra. Os testes apresentaram especificidade de 100%, entretanto, a sensibilidade do ELISA não foi relatada. Esse depósito teve seu pedido de patente concedido. Dois estudos mostrando a aplicabilidade dos polipeptídeos citados na patente foram encontrados na literatura e são descritos abaixo.

Sivakumar et al. (2006) clonaram, expressaram e purificaram um antígeno recombinante, Ld-rKE16, do gene cinesina de *L. donovani* para avaliar sua aplicação no ensaio de ELISA para o sorodiagnóstico da LV. O ELISA Ld-rKE16 foi comparado com ELISA LcrK39 em 106 amostras de pacientes com LV e 312 controles saudáveis ou portadores de doenças infecciosas. As sensibilidades e especificidades dos testes foram de 99 e 100% para Ld-rKE16 e de 97 e 97,5% para Lc-rK39.

Ao comparar as sequências do gene cinesina de *L. donovani* (KE16) e sua proteína, expressa com outro antígeno recombinante (Lc-rK39) a partir do gene cinesina de *L. chagasi*, foram encontradas variações genéticas relevantes entre os aminoácidos. A partir desses dados do antígeno rKE16 recentemente produzido, Sivakumar et al. (2008) clonaram e sequenciaram o gene homólogo da cepa *L. donovani* MHOM/IN/ DD8/1968. Os autores investigaram se a cepa MHOM/IN/DD8/1968 mantida *in vitro*, que passou por várias subculturas, desenvolveu alguma variação genética e avaliaram o seu potencial para diagnóstico da LV. A heterogeneidade genética do gene cinesina, e sua proteína expressa (DD8) a partir da cepa indiana MHOM/IN/ DD8/1968, foi avaliada com outras cinco cepas do Sudão e da Índia. Na análise comparativa com as outras sequências, observou-se que MHOM/IN/DD8/1968 apresentou 79% de homologia com *L. chagasi*, 80% com *L. infantum*, 82% com uma linhagem de *L. donovani* do Sudão, 82% com outra cepa de *L. donovani* da Índia e 83% com KE16 de *L. donovani* da Índia.

O potencial do DD8 (Ld-rDD8) para o sorodiagnóstico da LV e PKDL foi avaliado por ELISA e comparado ao Ld-rKE16 usando soro de 469 indivíduos (150 pacientes com LV, sete com PKDL, 50 de indivíduos saudáveis de área endêmica, 80 de indivíduos saudáveis de área não endêmica e 182 com diferentes doenças). Os resultados mostraram que todos os 150 soros de pacientes com LV e os sete soros de pacientes com PKDL foram reconhecidos por

ambos os antígenos, com valores médios de OD de 1.26 ± 0.56 para LdrDD8 e 1.42 ± 0.57 para rKE16, indicando que o Ld-rDD8 é menos sensível e específico quando comparado com o Ld-rKE16. Assim, os autores justificam o motivo pelo qual apenas o rKE16 deve ser comercializado.

Depósito P5-US20150072354A1 – proteínas LinJ16.1750r2, LinJ22.1590r3, LinJ28.2310 e LinJ33 2870r1

O depósito **US20150072354A1,** apresentado no ano de 2006 pelo Infectious Disease Research Institute dos Estados Unidos, relata a proteção de peptídeos de *Leishmania* úteis em kits diagnósticos a serem utilizados em bancos de sangue e na avaliação de cura da doença, bem como, sua aplicação no desenvolvimento de vacinas. As proteínas com repetição em tandem (TR) LinJ16.1750r2, LinJ22.1590r3, LinJ28.2310 e LinJ33 2870r1 identificadas como potenciais candidatas de diagnóstico, foram expressas como peptídeos recombinantes.

A antigenicidade dessas proteínas recombinantes foi avaliada por ELISA, utilizando amostra de soro de 10 pacientes com LV, 10 pacientes com LC, 10 pacientes com tuberculose, seis pacientes com malária, e controles saudáveis. Os soros dos pacientes com LV mostraram maior reatividade para as proteínas recombinantes, quando comparada à reatividade dos soros do grupo controle. Entre as proteínas testadas, a rLinJ16.1750r2 foi reconhecida fortemente por soros de pacientes com LV, mostrando ser específica para diagnosticar a doença.

Visto que rLinJ16.1750r2 apresentou maior reatividade, outro ELISA foi realizado utilizando 35 amostras de soros de pacientes sudaneses com LV. Destas, 34 reagiram com rLinJ16.1750r2. Ao realizar o ELISA utilizando rLinJ16.1750r2, a sensibilidade foi de 97%, comparável ao ELISA com rK39 (100%). Embora estes 35 soros tenham apresentado 100% de positividade no ELISA rK39, oito apresentaram baixa reatividade com rK39. Estas oito amostras foram testadas com rLinJ16.1750r2, rLinJ22.1590r3, rLinJ28.2310 ou rLinJ33.2870r1 para avaliar se esses antígenos poderiam complementar o rK39 e tornar o diagnóstico mais sensível. Cinco dos oito soros apresentaram melhores respostas a estes antígenos do que ao rK39. Este depósito foi abandonado.

Os mesmos resultados apresentados na patente foram também apresentados na publicação realizada por Goto et al. (2006) e confirmaram por ELISA alta prevalência de anticorpos contra os domínios da repetição dos antígenos em pacientes com LV utilizando as proteínas recombinantes rLinJ16.1750r2, rLinJ22.1590r3, rLinJ28.2310r1 e rLinJ33.2870. A

proteína LinJ16.1750 recombinante (rLinJ16.1750) apresentou o melhor desempenho entre esses antígenos, com sensibilidade de 97% (34/35). Não foi observada reatividade para pacientes com malária e tuberculose. Para os autores, os resultados sugerem que as proteínas com domínios repetitivos são fortes antígenos e que estas proteínas são úteis para o diagnóstico sorológico de LV.

Depósito P6-EP2085467B1 – peptídeos da saliva de *L. longipalpis*

O pedido de patente **EP2085467B1** depositado em 2002, pela Secretaria do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos e pela Fundação Oswaldo Cruz refere-se a proteínas salivares de *L. longipalpis* e os ácidos nucléicos que codificam estas proteínas aplicáveis à indução de resposta imune, diagnóstico e tratamento da infecção por *Leishmania*. No relatório descritivo, são apresentados resultados do ELISA e do WB utilizando um substrato antigênico contendo polipeptídeos presentes na saliva de *L. longipalpis*, avaliados em soro de 30 crianças provenientes de área endêmica com suspeita de LV, classificadas em dois grupos: 15 crianças com sorologia positiva e 15 crianças com resposta de hipersensibilidade tardia positiva (DTH^+) na reação intradérmica.

Ao realizar o ELISA com amostras de15 indivíduos com DTH^+ comparando o tempo zero e seis meses depois, os resultados mostraram aumento significativo de anticorpos IgG e IgE contra proteínas salivares de *L. longipalpis*. A subclasse de anticorpo IgG1 foi a principal imunoglobulina reativa contra proteínas salivares desses indivíduos. No grupo de indivíduos com sorologia positiva anti-*Leishmania* observou-se após seis meses, diminuição significativa de anticorpos IgG contra proteínas salivares. Na análise por WB de 13 soros selecionados aleatoriamente de pacientes com DTH^+, 12 reconheceram 16 proteínas salivares com intensidades diferentes. Uma proteína de 45 kDa foi reconhecida por 12 soros, seguida pelas proteínas de 35, 43 e 44 kDa, reconhecidas por oito soros, uma proteína de 17 kDa por seis soros e uma proteína de 16 kDa por cinco soros. O depósito teve seu pedido de patente concedida.

Estudos disponíveis na literatura científica relacionados às proteínas salivares citadas acima são voltados ao desenvolvimento de vacinas para as leishmanioses (GOMES et al., 2008; XU et al., 2011).

Depósito P9-WO2015001383A1 - Antígenos (H2A-P9 e P2a-P6) para detecção de anticorpos

Peptídeos e métodos para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* para diagnóstico de LC ou LMC são descritos no depósito **WO2015001383A1,** realizado em 2013 pelo Institut de Recherche pour le Developpement,da França e Universidad Peruana Cayetano Heredia. Os inventores relatam o sequenciamento de 75 peptídeos sintéticos de *L. infantum* que são reconhecidos por soros de pacientes com LC, entre estes, dois (H2A-P9 e P2a-P6) foram selecionados para preparação de um kit de ELISA. A avaliação do desempenho deste teste em soros de 33 indivíduos com LC mostrou sensibilidade de 94% e especificidade de 83%. A partir desses resultados, os autores afirmam que a invenção apresenta sensibilidade comparável à da PCR e melhor que os métodos parasitológicos.

Não foram encontrados estudos posteriores relacionados com a tecnologia apresentada na patente. O pedido de depósito encontra-se ativo.

Depósito P11-WO2009130709A2 – antígeno LAg

A invenção desenvolvida pela Council of Scientific & Industrial Research da Índia, descrita no pedido de patente WO2009130709A2 e depositada em 2008, refere-se a um antígeno de membrana não recombinante (LAg), caracterizado por um complexo de 25 a 35 polipeptídeos, de massa molecular variando de 18 a 155 kDa, obtido de promastigotas de *L. donovani*, útil para a detecção e quantificação de anticorpos IgG anti-*Leishmania* específicos no soro de pacientes com LV ou PKDL.

Amostras de soro de 122 pacientes com LV e 20 com PKDL foram testadas por ELISA, dot-ELISA e teste imunocromatográfico. O grupo controle incluiu amostras de 23 indivíduos saudáveis de área não endêmica, nove indivíduos saudáveis de regiões endêmicas para LV, 15 pacientes com hanseníase, seis com filariose, dois pacientes com tuberculose, um paciente com linfoma e um paciente com malária.

Após alguns testes para avaliar o ponto de corte e as diluições do anticorpo e do soro que demonstrassem o melhor desempenho, foi realizado o ELISA em 40 amostras de pacientes com LV, 13 pacientes com PKDL, 19 de indivíduos controles saudáveis residentes de área não endêmica, nove de indivíduos controles saudáveis de área endêmica para LV e 10 de pacientes com outras doenças como a malária, tuberculose, hanseníase, filariose e linfoma. Nestas condições, a sensibilidade do teste foi de 100% e a especificidade de 92%.

Com o objetivo de desenvolver um sistema de detecção para ser usado em campo e à temperatura ambiente, os inventores criaram um ELISA adaptado em fitas de membrana de nitrocelulose, chamado dot-ELISA. O dot-ELISA foi avaliado em diferentes diluições e

observou-se que na diluição 1:2000 de soro houve eliminação absoluta de reações cruzadas para as amostras de controle negativo. Foram testadas 20 amostras de pacientes com LV e 23 amostras de outras doenças infecciosas, sendo todas as amostras identificadas corretamente.

Outro teste desenvolvido foi o ensaio imunocromatográfico. Este teste se diferencia do dot-ELISA por dispensar o processo intermediário de lavagem do conjugado enzimático não ligado. Amostras de soros de 102 portadores de LV, 10 pacientes curados de LV, 20 com PKDL, 17 indivíduos saudáveis de regiões não endêmicas, 10 indivíduos saudáveis de área endêmica e 28 pacientes com outras doenças tropicais foram incluídos no estudo. Todas as amostras de pacientes com LV e com PKDL foram identificadas corretamente. Apenas uma amostra controle de indivíduo de área endêmica apresentou resultado falso-positivo. Estudos para aplicação deste antígeno não foram encontrados na literatura. Informações do status do depósito não foram encontradas.

Depósito P12-WO2014111207A1 - antígeno rKL08

O objetivo do depósito WO2014111207A1 realizado em 2013 pela Universidade Philipps Marburg, da Alemanha, é proteger um novo peptídeo útil no diagnóstico da infecção por parasitos do gênero *Leishmania,* especialmente aqueles causadores da LV.

No relatório, é descrita a clonagem, expressão em *E. coli* e purificação de uma proteína codificada pelo fragmento gênico KL08, proveniente de uma cepa de *L. donovani*, isolada no Sudão. A reatividade do rKL08 foi avaliada através de WB utilizando 10 amostras de soros de pacientes sudaneses com LV e 10 amostras de soros de indivíduos saudáveis de uma região não endêmica. Embora não tenham sido informados os dados de desempenho, os inventores afirmaram que neste experimento os soros de pacientes com LV reconheceram o rKL08, enquanto os soros de indivíduos saudáveis não reagiram com o polipeptídeo. Os autores concluíram que o rKL08 é adequado para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* específicos, em amostras de soros de pacientes portadores de LV.

Este antígeno também foi avaliado por ELISA e comparado com ELISA rK39, teste rápido rK39 (IT LEISH® Bio-Rad Laboratories) e DAT (ITMA-DAT/LV, Institute of Tropical Medicine, Bélgica) em 106 amostras de portadores de LV, três de PKDL e 77 amostras de controles negativos do Sudão e da Alemanha. Quando se comparou o ELISA rKLO8 com ELISA rK39, IT LEISH® e DAT, os testes apresentaram sensibilidade de 98,1, 96,2, 81,1, 94,3%, respectivamente e especificidade de 96,1, 94,8, 98,7 e 100%, respectivamente. Utilizando 38 amostras de pacientes com LV da Índia, o ELISA rKLO8 foi

comparado com o ELISA rK39, o IT LEISH® e o DAT. ELISA rKLO8, ELISA rK39 e IT LEISH® mostraram sensibilidade de 96,2%, ao passo que o DAT apresentou 92,3% de sensibilidade.

O ELISA rKLO8 foi também comparado com o ELISA rK39, o IT LEISH® e o DAT em 26 amostras de pacientes com LV da França. Nesta avaliação, o ELISA rKLO8 e o ELISA rK39 apresentaram sensibilidade de 100% e o IT LEISH® e o DAT, sensibilidade de 88,5%. Ao comparar os testes em 11 amostras de coinfectados LV/HIV da França, o ELISA rKLO8, o ELISA rK39 e o IT LEISH® apresentaram sensibilidade de 81,8% e o DAT 54,5%. O depósito foi abandonado.

Um artigo foi encontrado na literatura descrevendo alguns resultados apresentados na patente, com as mesmas amostras e metodologia da patente (ABASS et al., 2013).

Depósito P13-US20100330585A1 – ensaio de fluxo lateral modificado

A invenção presente no depósito **US20100330585A1,** realizado em 2007 pela InBbios International Inc dos Estados Unidos, refere-se ao um novo sistema que compreende uma formulação líquida de um conjugado indicador aplicado em dispositivo de ensaio de fluxo lateral modificado, útil para detectar a presença de anticorpos em amostras biológicas de pacientes portadores de leishmaniose, doença de Chagas ou sífilis.

O sistema de fluxo lateral protegido se diferencia do sistema convencional por não necessitar de um suporte sólido para o conjugado, neste caso, o conjugado é usado em uma formulação líquida com nanopartículas de ouro coloidal ou outras moléculas e aplicado ao dispositivo após a aplicação da amostra biológica e a solução tampão de corrida. A modificação no método possibilita simplificar a produção dos kits e redução nos custos, uma vez que não utilizará o suporte sólido do conjugado como nos métodos convencionais.

Para avaliar a aplicabilidade do sistema de fluxo lateral descrito, foi utilizado o antígeno rK39 para diagnóstico da LV. O teste foi comparado com o convencional, que utiliza o conjugado ouro em uma almofada seca. O desempenho do ensaio foi avaliado utilizando um *pool* de soros de pacientes reativos e de soros não reativos com K39. Os inventores não relatam o número de amostras utilizadas e os valores de sensibilidade e especificidade apresentados pelo teste. Porém, afirmam que os resultados indicam que o sistema com a formulação líquida protegido nesta patente é muito superior ao do sistema convencional. Esse depósito teve o pedido de patente concedido. O Kalazar Detect™ teste rápido para detecção qualitativa de anticorpos em amostras de soro produzido pela InBios International Inc dos

Estados Unidos, é um ensaio imunocromatográfico de tira que utiliza o sistema descrito na patente, no qual o conjugado é aplicado diretamente na fita.

Depósito P14-DE69836020T2 – antígeno DAT liofilizado

Em 1998, o Council of Scientific and Industrial Research da Índia realizou o depósito prioritário do depósito **DE69836020T2** publicado em 2007, descrevendo uma composição seca por liofilização, útil ao diagnóstico precoce da LV, contendo promastigotas de *Leishmania* spp. tratadas com tripsina, coradas com azul brilhante de coomassie e uma solução estabilizadora de proteína. A invenção é útil para o diagnóstico da LV em condições de campo utilizando a composição no DAT.

No relatório descritivo, é apresentada a padronização da preparação do antígeno líquido e liofilizado e, posteriormente, os autores descrevem a avaliação do composto em um DAT padronizado com ponto de corte de ≥ 1:3200. As amostras de soro de pacientes com LV mostraram aglutinação, enquanto as amostras de soro de pacientes portadores de tuberculose, hanseníase, doença amebiana, giardíase, malária, filariose e tripanossomíase, não apresentaram aglutinação. Não foram apresentados na prova de conceito desta patente o desempenho do teste e a descrição das amostras utilizadas. O depósito foi abandonado.

O DAT foi descrito para o diagnóstico da LT e LV pela primeira vez por Allain & Kagan, em 1975. O teste baseava-se em suspensões com promastigotas fixadas em formol como antígenos, utilizados em placas de microtitulação (ALLAIN & KAGAN, 1975). Posteriormente, em 1986, Harith e colaboradores, modificaram a técnica para utilização no diagnóstico sorológico da LV adicionando-se à preparação do antígeno o azul brilhante de coomassie, que possibilita melhor visualização em títulos superiores. Ao analisar soros de 280 indivíduos de área endêmica no Quêna, o teste mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 99,3% (HARITH et al 1986).

Vários trabalhos mostraram as modificações nos componentes e procedimentos realizadas no teste para aumentar a estabilidade, controlar a necessidade de resfriamento, aumentar o potencial para aplicação em larga escala e aplicação em campo. Atualmente, o teste é produzido com antígenos liofilizados e a solução estabilizante pode apresentar composição diferente entre os fabricantes (HARITH et al., 1988; MEREDITH et al., 1995; PEDRAS et al., 2008; OIVEIRA et al., 2009, 2011).

Há dois kits de DAT produzidos e comercializados por duas instituições europeias, o *Royal Tropical Institute* na Holanda e o *Prince Leopold Institute* na Bélgica. No Brasil, o

DAT foi aperfeiçoado pela FIOCRUZ, tendo sido produzido um protótipo de *kit* do teste de aglutinação direta contendo antígeno composto por promastigotas de *L. infantum* e demais reagentes necessários para a realização do teste (DAT-LPC). O DAT-LPC foi avaliado em 213 amostras de soro, sendo 103 de pacientes portadores de LV, 90 portadores de outras doenças parasitárias e 30 indivíduos saudáveis e os resultados comparados com os obtidos pelo DAT-*KIT*, produzido pelo "*The Royal Tropical Institute*" (Amsterdam, Holanda). As taxas de sensibilidade foram de 99% para ambos os testes, especificidade de 98,2% e 100% para o DAT-LPC e DAT-*KIT*, respectivamente. Além disso, foi demonstrada correlação positiva (Coeficiente de Sperman: 0,75) entre os títulos apresentados pelas amostras de soro ensaiadas pelo DAT produzido com *L. infantum* (DAT-LPC) ou *L. donovani* (DAT-*KIT*), indicando que esses apresentam o mesmo desempenho diagnóstico (OLIVEIRA et al., 2013)

Depósito P15-US20030072714A1 – antígenos de lisado

O depósito **US20030072714A1,** realizado pelo U.S. Army Medical Research and Materiel Command publicado em 2003 com data de prioridade em 2001, reivindicou proteção para o uso de lisados de *Leishmania*, métodos de preparação e aplicação das composições imunogênicas padronizadas para um teste intradérmico de diagnóstico da LC. Cepas de *L. tropica* foram isoladas, clonadas e caracterizadas por análise de isoenzimas para serem utilizadas nas preparações antigênicas, sendo que os autores ressaltam que a invenção não se restringe a esta espécie e pode ser realizada com todas as outras espécies de *Leishmania*.

No relatório descritivo, foram apresentados o desenvolvimento e a padronização do lisado de *L. guyanensis* e de *L. mexicana,* a serem utilizados em um teste intradérmico. Para a preparação do lisado, parasitos foram isolados de lesões cutâneas ativas, clonados e posteriormente expandidos em meio de cultura. Promastigotas foram coletadas, centrifugadas, lavadas cinco vezes e processadas através de um microfluidizador. Por fim, as preparações foram filtradas em filtros estéreis.

Em um terceiro exemplo é apresentada a preparação do lisado de *L. tropica* e sua avaliação realizada em aplicações intradérmicas em 10 indivíduos. Entre as doses avaliadas, 25 μg da preparação mostrou-se segura em seis dos 10 pacientes. Três pacientes foram retirados do estudo por apresentarem efeitos adversos indesejados após a aplicação e um por ter se mudado da área. O efeito de hipersensibilidade apresentado em alguns pacientes foi associado com o dextrano usado como diluente. Assim, a preparação foi reformulada com

0,4% de fenol como conservante e testada em 15 pacientes, determinando-se que 38 µg da preparação é uma dosagem segura.

Para avaliar a segurança da preparação, determinar sensibilidade e especificidade de diferentes doses de antígeno, avaliar a capacidade de sensibilização, comparar a intensidade das respostas e reação cruzada com antígenos homólogos e heterólogos, 60 pacientes com LC ativa, 60 indivíduos saudáveis e 60 indivíduos com feridas de leishmaniose cicatrizadas foram avaliados, porém, os autores não descreveram os resultados obtidos neste estudo.

Como critério de inclusão, definiu-se indivíduos com resposta positiva a dois testes intradérmicos, para caxumba e para *Candida albicans*. De modo a determinar a magnitude de reatividade cruzada dos lisados, ao mesmo paciente foram administradas três preparações diferentes contendo *L. mexicana*, *L. tropica*, e *L. guyanensis*. Segundo os inventores, este desenho permitiu a comparação direta das três preparações e reduziu o número de pacientes do estudo. Três grupos com 20 indivíduos saudáveis participaram do estudo. Injeções intradérmicas de solução salina e de 1:100 do diluente foram administradas como controles. No primeiro grupo foram administradas preparações de lisados de microfluidos com concentrações de proteína total de 5 µg cada. Na ausência de reação, no prazo de dois dias após a administração no grupo 1, seria usada a dosagem de 15 µg de proteína no grupo 2. Caso não fosse observada nenhuma reação após a administração de 15 µg de proteína no grupo 2, no grupo 3 eram administrados 30 µg de proteína total. No documento os inventores detalharam a metodologia, porém, não apresentaram os resultados.

Não foram encontradas publicações de desenvolvimento adicional desta tecnologia na literatura científica. O depósito foi abandonado.

Depósito P17-US7452721B2 – exo-antígenos solúveis e/ou anticorpos específicos IgG e/ou IgM

A invenção descrita pela Secretaria do Exército dos Estados Unidos publicada em 2008 no depósito **US7452721B2** e com data de prioridade em 1999, diz respeito a imunoensaios (ELISA e reação de imunofluorescência direta) que permitam a detecção de antígenos solúveis e/ou de anticorpos específicos IgG e IgM de leishmânias causadoras da LT e LV em seres humanos e cães.

Ensaios imunoenzimáticos realizados com exo-antígeno de *L. donovani* e exo-antígeno de *L. mexicana* foram realizados para diagnosticar LC e LV, respectivamente. A sensibilidade do ELISA com WR0130E exo-antígeno de *L. donovani*, quando testado em 129 amostras com

diagnóstico parasitológico confirmado para LV foi de 100% para IgG e de 94,6% para IgM. O ELISA com exo-antígeno de *L. mexicana* (ATCC 50157) foi realizado em 143 amostras de pacientes com LC confirmadas parasitologicamente. O teste apresentou sensibilidade de 92,3% para IgG, no entanto, a sensibilidade para detecção de anticorpos IgM foi de apenas 37,9%.

Um ensaio por imunofluorescência direta usando anticorpos policlonais marcados com fluoresceína, produzidos contra antígenos específicos de *Leishmania*, foi apresentado. O anticorpo marcado liga-se especificamente aos antígenos presentes na membrana do parasito e pode ser detectado em um esfregaço de material de cultura ou de biópsia do paciente. Na patente não há descrição das amostras, nem o seu desempenho, porém os inventores afirmam que o ensaio mostrou sensibilidade para a detecção de amastigotas em tecidos de pacientes com LC e aspirados esplênicos de pacientes com LV.

Titulações em bloco foram realizadas para otimizar as etapas do ELISA, estabelecendo diluição de 1:500 e concentração de 50 µg/mL dos exoantígenos. O relatório descreve que foram avaliados 22 soros de pacientes com leishmaniose de uma área endêmica do norte da África e cinco controles negativos, usando o novo protocolo. Os resultados mostraram 100% de sensibilidade e especificidade. Este depósito foi abandonado.

Dois estudos mostrando aplicabilidade dos exoantígenos apresentados na patente foram encontrados na literatura científica. O estudo descrito abaixo apresenta alguns dados que já foram apresentados na patente (RYAN et al., 2002). O outro estudo não será descrito, pois o foco do desenvolvimento foi em LV canina (RAJASEKARIAH et al., 2008).

Ryan et al. (2002) publicaram alguns dados experimentais apresentados na patente, mostrando a aplicação de antígenos solúveis de promastigotas de *L. donovani* e *L. mexicana* cultivadas num meio isento de proteína. O ELISA realizado com amostras de soro de pacientes portadores de LC e LV mostrou sensibilidade de 95,1% (262/272), sendo avaliados soros de 143 com LC e 129 pacientes com LV.

Depósito P18-DE69432417T2 – proteína A2

A proteção da proteína A2 (22 kDa) de *Leishmania* expressa em amastigotas do parasito é reivindicada no depósito **DE69432417T2** publicado em 2004 com data de prioridade em 1993, realizado pela Universidade McGill Montreal do Canadá. Esta proteína pode ser utilizada em diagnóstico, vacinas e para gerar formas atenuadas de *Leishmania*.

No relatório descritivo, foram apresentados os métodos para isolar, clonar e expressar a proteína A2 em sistema heterólogo. A proteína A2 foi marcada e imunoprecipitada com soro de pacientes com LV e analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Soros de pacientes com LV reagiram fortemente contra o antígeno A2 de *L. donovani* e não reagiram contra a proteína humana p53, usada como controle negativo. Ao avaliar a proteína A2 com os soros utilizados como controle, não houve reatividade, mostrando que o produto do gene A2 de *L. donovani* era especificamente reconhecido pelo soro de pacientes com LV.

Para confirmar a especificidade da reação, uma proteína de fusão de 27 kD foi produzida com a proteína A2 e um plasmídeo de controle negativo pET 16b sem inserção. Após a expressão desta proteína de fusão, os lisados totais das células de *E. coli* recombinantes foram separados por SDS-PAGE e analisados por WB utilizando soro de paciente com LV. O soro reagiu especificamente com produtos proteicos de 25 kD e 27,5 nos lisados de células contendo o plasmídeo pET 16b/ORF II. A proteína de 25 kDa provavelmente corresponde à proteína A2 sem a cauda de His, uma vez que a sequência de A2 continha o seu próprio ATG de iniciação. O soro não reagiu com proteína de lisados de *E. coli* contendo o plasmídeo de controle pET 16. Estes dados confirmaram que a ORF II do gene A2 codificava uma proteína de *L. donovani* (A2) que é antigênica em pacientes com LV. Dados sobre o desempenho e em quantas amostras foram utilizadas nos testes não foram apresentados. Este depósito foi abandonado. A busca na literatura por desenvolvimento relacionado com a proteína A2 apresentada na patente resultou em dois estudos, descritos abaixo.

Carvalho et al. (2002) investigaram a presença de anticorpos anti-A2 em um painel de soros humanos e caninos. As amostras de soros humanos foram obtidas de 68 casos de LV e 86 controles, sendo: 13 casos de leishmaniose mucosa, 33 casos de LC, 20 casos de tuberculose e 20 de hanseníase. Duas preparações de antígenos recombinantes foram produzidas neste estudo. A primeira é uma fusão da proteína A2 com a glutationa S transferase de *Schistosoma japonicum* (A2-GST) e a segunda é a proteína A2 contendo uma cauda de seis resíduos de histidina (A2-HIS). Inicialmente, foi realizada a detecção de anticorpos por ELISA usando a proteína recombinante A2-His e SLA nos grupos A e B de amostras de soro canino.

A avaliação de anticorpos anti-A2 em humanos foi examinada utilizando-se painel de soros de 68 pacientes com LV, 33 pacientes com LC, 13 pacientes com LM, 20 pacientes com hanseníasee 20 pacientes com tuberculose. Os anticorpos anti-A2 foram detectados em 77%

dos 68 soros de pacientes com LV e a reatividade com SLA foi de 83,7%. Anticorpos anti-A2, também foram detectados em 60% de 13 pacientes com LM e em 30% de 33 pacientes com LC. A reatividade cruzada com A2-HIS foi detectada em 0,5 e 10% dos soros de pacientes com tuberculose e hanseníase, respectivamente.

O trabalho publicado por Akhoundi et al. (2013) teve como objetivo desenvolver um teste de aglutinação em látex (LAT) para a detecção rápida de anticorpos contra o antígeno A2, comparando com antígenos brutos de promastigotas de *L. infantum* (Pro-LAT). O antígeno A2 foi preparado a partir de *L. infantum*, purificado por eletroeluição. Foram avaliadas 43 amostras de soros de pacientes com LV confirmados por exame parasitológico e DAT, 30 amostras controle e 32 amostras de pacientes com outras infecções. Ao analisar o antígeno LAT A2 apresentou sensibilidade de 88,4% e especificidade de 93,5% para diagnóstico da LV em soros humanos. De modo semelhante, quando foi utilizado o antígeno ProLAT, as taxas de sensibilidade e especificidade foram de 88,4% e 91,9% para os soros humanos, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre LAT A2 e ProLAT para a detecção de infecções por *L. infantum* em humanos e cães. Os autores concluem que LAT A2 e ProLAT poderiam ser usados em paralelo para a seleção de casos de infecções em humanos e cães em área endêmica para LV, visto que os resultados dos testes foram bons e estão disponíveis entre 3 a 5 minutos.

Depósito P19-US20060211056A1 – antígenos de 30-36 kDa

No depósito US20060211056A1 do Institut Pasteur da França, realizado em 2005, são descritos a purificação e isolamento de polipeptídeos da fração de 30-36 kDa de membrana de promastigotas de *L. infantum*, bem como os anticorpos que reagem contra peptídeos dessas frações, que apresentam potencial para serem utilizados no sorodiagnóstico da LV.

Numa primeira abordagem, as bandas proteicas coradas com azul de coomassie (P32 e P33 kDa), que reagiram especificamente em WB com soros de pacientes com LV, foram excisadas do gel e submetidas a digestão enzimática para gerar peptídeos. Quatro peptídeos foram sequenciados, três dos quais foram associados a antígenos imunorreativos para LV e atribuídos a uma proteína transportadora mitocondrial integrante ADP/ATP de *L. major*. Uma segunda abordagem combinada de eletroforese bidimensional (2DE) de antígenos de membrana e de EM identificou seis pontos imunorreativos, dentro das faixas de 30-36 kDa de massa molecular, que corresponderam a quatro produtos de *Leishmania*.

No relatório descritivo, os inventores realizaram WB e ELISA para avaliar a reatividade do peptídeo P32 (32 kDa). No WB, o antígeno P32 foi reconhecido por 95% das amostras de soros de pacientes portadores de LV, mas não foi reconhecido por soros de portadores de LC. Não há informação sobre o número de amostras utilizadas no WB. Resultado semelhante foi observado no ELISA, utilizando nove soros de pacientes com LV e 10 soros de pacientes com LC (94% de sensibilidade e especificidade). As nove amostras de soros de pacientes com LV reagiram com as bandas de 32 e 33 kDa, e em menor medida, com bandas de 30 kDa (7/9) e de 36 kDa (4/9).

As bandas com 32 e 33 kDa foram analisadas e quatro peptídeos selecionados para a produção, P1 e P2 a partir da banda de 32 kDa e P3 e P4 a partir da banda de 33 kDa. Estes peptídeos foram sintetizados e inoculados em coelhos para a produção de anticorpos policlonais. Soros anti-P1 e P2 reagiram fortemente por WB com uma banda principal do antígeno de 33 kDa e, em menor intensidade, com uma banda adicional de 30 kDa. Soros anti-P3 reagiram por WB especificamente com uma banda de 35 kDa e os soros anti-P4 não reagiram com qualquer proteína de membrana na faixa de 30-36 kDa. Os inventores informam que os peptídeos P1, P2 e P3, quando testados por ELISA, reagiram fortemente e especificamente com soros de pacientes com LV em comparação com soros de pacientes portadores de LC e de indivíduos saudáveis, porém estes dados não foram apresentados na patente. O depósito foi abandonado e não foram encontrados estudos subsequentes para diagnóstico ou outras aplicações relacionadas com a invenção apresentada na patente.

5.3.4 Proteínas biomarcadoras do hospedeiro

Depósito P16-WO2009059409A1 – Biomarcadores

Biomarcadores à base de proteínas e suas combinações úteis para detectar leishmaniose em pacientes foram apresentados no depósito **WO2009059409A1** pela Mcgill University do Canadá, em 2007. Os biomarcadores descritos representam proteínas ou fragmentos de proteínas expressas em indivíduos infectados por um parasito do gênero *Leishmania*. Estas moléculas podem ser aplicadas no diagnóstico, utilizando como técnica de detecção EM com captura por afinidade (Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization - SELDI).

Os biomarcadores para serem utilizados no diagnóstico podem ser fornecidos em kits. O kit compreende um suporte sólido, tal como um chip, uma placa de microtitulação ou uma

esfera de resina, tendo um reagente de captura ligado a ele, em que o reagente de captura liga-se ao biomarcador. Assim, por exemplo, os kits da presente invenção podem compreender sondas de EM de SELDI, tais como matrizes ProteinChip.

Além do uso em diagnóstico, a invenção descreve também a possibilidade de utilizar os biomarcadores para selecionar compostos que modulam a expressão dos biomarcadores *in vitro* ou *in vivo*, os compostos que por sua vez podem ser úteis na prevenção ou no tratamento da leishmaniose. Em outro exemplo, os biomarcadores podem ser usados para monitorar a resposta ao tratamento ou para determinar se o indivíduo está em risco de desenvolvimento da doença.

Usando tecnologia SELDI em matrizes Ciphergen ProteinChip de Biosystems, Inc. ("Ciphergen") com amostras de soro colhidas de indivíduos diagnosticados com LV, antes do tratamento (pré-tratamento) e depois do tratamento com estibogluconato de sódio, foi possível determinar as características e quais biomarcadores seriam capazes de distinguir indivíduos positivos e negativos, formando assim um modelo de classificação para ser aplicado em amostras desconhecidas.

Os biomarcadores individuais se mostraram úteis no diagnóstico, portanto descobriu-se que uma combinação dos biomarcadores pode proporcionar maior valor preditivo do que os biomarcadores individuais sozinhos. Especificamente, a detecção de uma pluralidade de biomarcadores numa amostra pode aumentar a sensibilidade e/ou especificidade do ensaio.

Para demonstrar prova de conceito, os inventores apresentam um teste de EM com os biomarcadores utilizando amostras de soro de 64 indivíduos que foram divididas em dois grupos: grupo 1 (composto por 21 amostras de pacientes coletadas antes do tratamento para LV e 19 controles saudáveis, da mesma região geográfica) e grupo 2 (24 amostras de pacientes coletadas antes do tratamento para LV, usadas para validar o grupo 1).

Os soros e controles pré-tratamento foram fixados em dois diferentes superfícies de matriz (ProteinChip ™: Ciphergen Biosystems Inc.) com o chip de troca catiônica fraca (CMlO) e imobilizado na matriz de chips para captura de afinidade acoplada com metal de cobre (IMAC-Cu 2+).

Os dados dos perfis de proteínas de soro dos pacientes com LV e controles saudáveis foram comparados uns com os outros para detectar biomarcadores. Os picos passaram primeiro por uma análise automática usando o gerenciador de dados CiphergenExpress 2.1 que usa como método $p < 0,05$ e ROC, e posteriormente por uma análise manual recalculando $p < 0,001$ e ROC dos picos.

Após as análises realizadas um total de 212 potenciais biomarcadores com peso molecular entre 2,5 e 157 kDa foram detectados. Um biomarcador com PM de 12463Da encontrado em F61H foi capaz de distinguir com sucesso as amostras positivas e as negativas (controle) com um valor de p significativo e um sinal de alta intensidade.

O resultado da árvore de classificação mostrou que a combinação de três biomarcadores é capaz de detectar corretamente todos os 21 soros positivos e os 19 controles. O primeiro biomarcador (MW de 51.351 Da) detectou corretamente 17 das 21 amostras positivas, o segundo biomarcador (MW de 28.238 Da) detectou corretamente outras três amostras positivas, e finalmente o terceiro biomarcador (MW de Da 3379) identificou corretamente a amostra positiva restante dentre as 21 amostras avaliadas. Assim, por combinação dos três biomarcadores foi possível distinguir com sucesso todos os pacientes positivos.

Uma análise foi realizada pelo Biomarker Pattern Software (BPS), que é um software baseado em classificação supervisionada de conjunto de dados das massas espectrais e foram encontrados 15 biomarcadores, estes foram avaliados em 24 amostras de pacientes com LV do grupo dois. Nesta análise, 14 dentre os 15 biomarcadores foram detectados nas amostras. Apenas uma proteína com peso molecular de 9478Da (encontrada no grupo 1 em F5IL) não foi detectável neste grupo de amostras.

O estudo mostra que SELDI-TOF-MS pode ser utilizado com êxito para detectar biomarcadores candidatos em doentes com LV. Usando Cipbergen Express o maior número de biomarcadores foi detectada na fracção seis ligada em matrizes IMAC30, ao passo que utilizando os dois programas de softwares o maior número foi encontrado na fracção quatro em matrizes CMlO. Informações a respeito do status do depósito não foram encontradas.

Não foram encontrados na literatura estudos usando a metodologia SELDI para diagnóstico de LV. Foi encontrado apenas um estudo descrevendo vantagens e desvantagens da tecnologia SELDI em EM (NDAO et al., 2010).

5.3.5 Diagnóstico molecular

L7-Nucleic acid sequence based amplification

Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) é um método baseado na transcrição reversa, especificamente concebido para a amplificação de RNA ou sequência simples de DNA. Graças à integração da atividade de transcrição reversa no processo de

amplificação, o método é especialmente adequado para amplificação de RNA (RNAm, RNAr, RNAt), utilizando dois iniciadores específicos para o alvo de RNA e três enzimas: transcriptase reversa, RNA polimerase T7 DNA dependente (DdRp) e RNase H. A avaliação do teste NASBA para LC foi realizada em amostras de biópsias de pele de pacientes com LC, e revelou 97,5% sensibilidade e 100% de especificidade (VAN DER MEIDE et al., 2005). Ao comparar NASBA com qPCR em 84 amostras de biópsias coletadas de pacientes com LC, a técnica NASBA mostrou-se mais sensível detectando 100 parasitos por ml (VAN DER MEIDE et al., 2008). Para o diagnóstico da LC, a técnica também foi avaliada para detecção e quantificação da resposta ao tratamento e no seu diagnóstico, em associação com a oligocromatografia, apresentando sensibilidade de 87,5% a 100% e especificidade de 100% (SAAD et al., 2010).

Em associação com a oligocromatografia no diagnóstico da LV, a técnica NASBA foi aplicada na detecção e quantificação da resposta ao tratamento e no seu diagnóstico, os resultados do teste apresentaram sensibilidade variando de 95,3% a 96,8% (SAAD et al., 2010). Basiye et al. (2010) avaliaram a NASBA acoplada em oligocromatografia (NASBA-OC) para a detecção molecular de *Leishmania* no sangue de 84 pacientes com LV e 98 controles endêmicos saudáveis do Quênia. Os resultados do teste mostraram sensibilidade de 79,8% e especificidade de 100%.

O depósito de patente WO2002070735A2 realizado pela BioMerieux da França em 2001, trata-se da amplificação baseada na sequência de ácidos nucléicos (NASBA) e tem sido atualmente avaliada para o diagnóstico das leishmanioses. Na patente encontrada, o escopo de proteção é apenas da técnica, no documento não há reivindicações e prova de conceito para leishmaniose. Portanto, não foi resgatada pela estratégia de busca utilizada, sendo encontrada a partir da literatura.

L8-Loop-mediated isothermal amplification

Outra técnica que utiliza amplificação de DNA para o diagnóstico das leishmanioses é o "*loop-mediated isothermal amplification*" (LAMP). Este método utiliza a enzima *Bst* DNA polimerase que é capaz de amplificar grandes quantidades de DNA em condições isotérmicas, dentro de 30-60 minutos, e atua em associação com quatro a seis iniciadores que reconhecem de seis a oito regiões específicas da sequência alvo do DNA. O alvo utilizado é a região conservada do gene 18S do RNA ribossômico. Os produtos da amplificação foram visualizados pela adição de reagente de detecção de fluorescência na etapa de pré-

amplificação e com a utilização de sistema de lâmpada ultravioleta. Foi possível detectar infecções entre 10 e 100 parasitos por mL. A avaliação com 43 amostras de biópsias cutâneas provenientes de 17 pacientes do Suriname resultou em 98% de sensibilidade, utilizando a PCR tempo real como padrão-ouro. As amostras foram coletadas antes do tratamento e durante o acompanhamento do tratamento por quatro semanas. Nesse estudo não foi avaliada a especificidade. (ADAMS et al., 2010).

Em outro estudo, o mesmo protocolo foi avaliado em amostras de lesões cutâneas de camundongos, obtidas com o uso de *swabs* de algodão. Para a extração do DNA genômico, duas metodologias foram utilizadas: com uso de kit comercial de extração e pelo aquecimento do *swab* à 100ºC por 10 minutos (*Direct boil-LAMP*). O limite de detecção observado foi de 1000 parasitos/mL (MIKITA et al., 2014).

Já para o diagnóstico da LV, a técnica LAMP foi avaliada em amostras de sangue de pacientes com LV do Sudão e apresentou sensibilidade 83% em comparação com a microscopia de medula óssea e aspirado de linfonodo (ADAMS et al., 2010). TAKAGI et al. avaliaram a LAMP para detecção de DNA de *L. donovani* em dez amostras de sangue venoso de pacientes confirmados com LV por biópsia do baço em Bangladesh. Nesse estudo a técnica LAMP detectou 1 fg de DNA de *L. donovani*, sendo 10 vezes mais sensível do que a PCR convencional.

Khan et al. (2012) avaliaram a acurácia diagnóstica da LAMP para detectar DNA de *Leishmania* em creme leucocitário de 75 pacientes confirmados com LV por exame parasitológico e em 101 controles. O ensaio para LAMP revelou sensibilidade de 90,7% e especificidade de 100%.

Verma et al. (2013) avaliaram a aplicabilidade do ensaio LAMP para um diagnóstico molecular rápido e confiável de LV e PKDL. Neste estudo, a técnica apresentou sensibilidade de 96,4% em amostras de sangue, 100% em amostras de aspirado de medula óssea. Em amostras de biópsia de tecido de pacientes com PKDL, a sensibilidade foi de 96,8%. O teste apresentou especificidade de 98,5%. Diante dos resultados, os autores concluíram que o ensaio foi específico para *L. donovani*. Não há nenhum estudo validando a técnica para diagnóstico das leishmanioses no Brasil.

Dois depósitos de patentes foram identificados protegendo a técnica: US20080182312 depositado pela Meridian Bioscience Inc em 2009 e US6100078A realizado pela Gen-Probe Incorporated em 1994. Essas duas patentes não apresentam reivindicações para leishmaniose, no entanto foram encontradas através da literatura e/ou palavras chave. A empresa japonesa Eiken Chemical Co. Ltd, em parceria com a Foundation for Innovative New Diagnostics

(FIND) desenvolveu kits em plataforma LAMP para diagnóstico de tuberculose, malária e tripanossomíase africana. O desenvolvimento de kits para LV, LC e doença de Chagas estão em andamento (FIND, 2015).

L9-*Leishmania* OligoC-Test

O estudo realizado por Espinosa et al. (2009) avaliou o teste molecular *Leishmania* OligoC-Test. Este teste é produzido pela empresa Belga, Coris BioConcept, e consiste em um método para amplificação de DNA de *Leishmania* do gene 18S ribossomal seguido por um único passo em membrana oligocromatográfica, usando partículas de ouro coloidal e sondas oligonucleotídicas específicas. A empresa Coris BioConcept, da Bélgica, depositou em 2003 o depósito WO2004099438A1, protegendo o uso e método de membranas oligocromatográfica. Esse depósito não apresentou reivindicações e nem prova de conceito para leishmaniose, portanto não foi encontrado pela estratégia de busca.

A avaliação do deste foi realizada em amostras de 44 pacientes com suspeita de LC. A sensibilidade do teste foi de 74% e 92% para aspirados e raspagens de lesão, respectivamente. Segundo informações apresentadas pelo fabricante, o teste foi avaliado em amostras de 56 pacientes com LC confirmada por métodos parasitológicos e oito indivíduos com exame parasitológico negativo. Os resultados do teste mostraram sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. Este teste não foi avaliado no Brasil.

L10-Biossensores

Através da prospecção na literatura identificou-se também o uso de biossensores eletroquímicos na detecção de DNA para diagnóstico da LV. Biossensores de DNA à base de óxido de níquel nanoestrutrurado foram desenvolvidos. Os resultados demonstraram boa reprodutibilidade nas análises de isolados de *L. donovani* com concentração variando entre 2 pg/mL e 2 µg/mL de DNA genômico. Embora os resultados iniciais sejam promissores, são necessários novos estudos com utilização de amostras clínicas para a avaliação do seu desempenho diagnóstico (Mohan et al., 2011).

Foi identificada a patente US7615780B2, depositada pela General Electric Company dos Estados Unidos, abrangendo um biossensor de DNA e os seus métodos de produção. Esta patente também não foi reivindicada especificamente para LV, mas poderá ser aplicada no desenvolvimento de kits para o seu diagnóstico. Uma nova perspectiva é a adaptação de

métodos isotérmicos de amplificação do DNA em biossensores. Esta técnica já foi utilizada para amplificação e detecção em tempo real do DNA do vírus da hepatite B e da *Escherichia coli* (SAFAVIEH et al., 2012; DATTA et al., 2014;), podendo futuramente ser padronizada para o diagnóstico de LV.

L11-PCR em tempo real (qPCR)

Foulet et al. (2007) desenvolveram a qPCR para o gene 18S que identifica todas espécies de *Leishmania*, com possibilidade de identificação das espécies pelo sequenciamento do gene citocromo b. Cinquenta e três amostras clínicas foram analisadas de diferentes regiões geográficas que incluíam amostras de sangue, aspirado de medula óssea, biópsia e aspirado da lesão, nove cepas de referência cultivadas em laboratório e 13 cepas de referência da OMS. Todas as amostras foram positivas para a amplificação do gene citocromo b e seis espécies foram identificadas. Baseando nesses resultados observou-se que o gene citocromo *b* poderia ter sido utilizado tanto para diagnóstico positivo, quanto identificação da espécie. Os autores afirmaram que o uso da qPCR seguida por sequenciação do gene citocromo b é uma alternativa para o diagnóstico da leishmaniose e identificação das espécies para um tratamento adequado.

Weirather et al. (2011) realizaram um estudo para avaliar a qPCR para detectar, quantificar e diferenciar as espécies de *Leishmania*. O teste desenvolvido é constituído por um ensaio multiplex, ou seja, a reação é realizada com vários alvos de amplificação ao mesmo tempo. De acordo com os autores, o teste é sensível para detectar baixos níveis de parasitos e distinguir espécies de *Leishmania* em amostras humanas. O estudo ainda se encontra em fase inicial e não apresenta dados de desempenho.

Outro estudo avaliando a qPCR foi realizado no Peru, avaliando 156 pacientes com suspeita de LC, mucosa ou mucocutânea. Foram encontrados 97,9% e 87,5% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Dentre os 156 pacientes, 24 apresentavam lesões mucosas, sendo que todos os casos foram confirmados por qPCR. Os autores destacam que a especificidade encontrada pode ser superior, já que a técnica de qPCR apresenta maior sensibilidade do que a técnica de PCR convencional (utilizada como padrão-ouro) (JARA et al., 2013).

A qPCR foi também avaliada na Turquia pelo estudo conduzido por Toz et al. (2013). O objetivo deste estudo foi avaliar um método de PCR em tempo real com base na região do espaçador interno transcrito 1 (ITS1) para diagnóstico de todas as formas clínicas de

leishmaniose do Mediterrâneo. No total, 315 amostras obtidas a partir de casos com LC humana (223), LV humana (40) e LC canina (52), originados de 31 províncias diferentes da Turquia foram incluídas no estudo. O método foi realizado utilizando amostras clínicas e foi repetido duas vezes para cada lote de amostras. Foram incluídos um controle positivo e dois controles negativos para cada reação da PCR. A sensibilidade encontrada para o ensaio foi de 94,1%. O ensaio de PCR em tempo real ITS1 identificou 80,4% de *L. infantum* em amostras de LV humana e canina, enquanto *L. tropica* foi detectada em 6,5%. Segundo os autores, a principal limitação do estudo foi a presença de dois picos em algumas amostras, provavelmente devido à variedade genética na região ITS1. Portanto, os autores concluíram que o teste apresenta sensibilidade suficiente para o diagnóstico rápido e correto da leishmaniose em todos os tipos de amostras clínicas.

Tsukayama et al. (2013) desenvolveram um estudo no Peru, avaliando o desempenho da qPCR baseado na fluorescência de transferência de energia de ressonância (FRET). Cento e noventa e duas amostras (178 amostras de biópsia de lesão de pele e 14 amostras de raspagem de lesão) de pacientes com lesões suspeitas de LT foram avaliadas. Amostras de DNA de *Homo sapiens* (20 ng DNA), *Trypanosoma cruzi* (1–2 ng DNA), *Trypanosoma cruzi* da cepa Tulahuen (1– 2 ng DNA), *P. falciparum* cepa D6(1–2 ng DNA) e *P. vivax* (20 ng DNA) foram utilizadas para analisar reação cruzada. Quando kDNA-PCR foi usado como o padrão ouro para o diagnóstico da leishmaniose, a qPCR apresentou 92% e 77% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Para os autores, devido à confiabilidade, curto tempo para resultados e simplicidade, este ensaio pode ser usado para identificação de espécies e diagnóstico laboratorial da LT em regiões endêmicas.

Adams et al. (2014) realizaram um estudo na Colômbia para avaliar o uso da qPCR para diagnóstico da LC utilizando amostras coletadas com *swab* e aspirado de lesão de 105 pacientes com suspeita de LC. A detecção do DNA foi avaliada em cada tipo de amostra com *primers* que amplificam a região 18s rDNA de *Leishmania.* A combinação de *swab* e extração de DNA por kit comercial (Qiagen) seguida por amplificação em qPCR apresentou o melhor desempenho diagnóstico: sensibilidade de 98% e especificidade de 84%. Os autores argumentaram que a especificidade pode ser, na realidade, superior ao valor apresentado, pois as técnicas parasitológicas utilizadas como padrão-ouro apresentam baixa sensibilidade.

Um kit comercial de qPCR (Stat-Nat® *Leishmania* spp.), disponível comercialmente, possui duas patentes relacionadas que não foram resgatadas pela estratégia de busca: US20130196319A1, depositada em 2011 pela Detectogen dos Estados Unidos e WO2010133628A1, depositada em 2009 pela Sentinel Diagnostics da Iália. A patente

US20130196319A1 abrange um método para determinar a presença, espécie e/ou quantificação de *Leishmania* e apresenta apenas um CIP que não se encontra na estratégia de busca. Já a patente WO2010133628A1 reivindica um método de preparo de uma composição liofilizada contendo enzima de polimerização e celobiose para utilização em aplicações moleculares e não apresenta reivindicações para leishmaniose.

5.4 Estudo de caso do antígeno K39

O primeiro depósito de patente a reivindicar proteção para um kit de diagnóstico que utiliza o rK39, bem como, a combinação deste com a glicoproteína principal de superfície de *Leishmania* gp63, foi realizado pela Corixa Corporation (Estados Unidos) com data de prioridade de 1993 e o seguinte número de publicação DE69417541T2.

A Corixa Corporation é uma empresa farmacêutica com foco em desenvolvimento de produtos imunoterapêuticos para doenças infecciosas, autoimunes e câncer. Com sede em Seattle, Estados Unidos, a empresa que foi fundada em 1994, apresenta uma plataforma tecnológica abrangente e um portfólio com vários produtos, incluindo alguns em avaliação, tais como: vacinas para leishmanioses, tuberculose e adjuvantes para uso em vacinas contra hepatite B e herpes (CORIXA, 2016). Em 2005, a multinacional britânica, GlaxoSmithKline (GSK), comprou a Corixa Corporation por US$ 300 milhões, adquirindo os direitos ativos da empresa. A GSK tem como missão descobrir e desenvolver novos medicamentos, vacinas e produtos de saúde, de modo que seja capaz de sustentar um pipeline de produtos que ofereça melhorias na qualidade de vida dos pacientes e profissionais de saúde (GSK, 2016).

Na literatura científica, a primeira publicação relacionada ao rK39 é de 1993, quando Burns et al. relataram a clonagem, expressão e a primeira avaliação do rK39 realizada por ELISA, apresentando sensibilidade de 98,2% em 57 soros de pacientes brasileiros diagnosticados com LV e de 100% em 52 soros de pacientes sudaneses. Posteriormente, vários estudos foram publicados apresentando o desempenho do ELISA utilizando este antígeno (BADARÓ et al., 1993; QU et al., 1994; SINGH et al., 1995; BADARÓ et al., 1996; ZIJLSTRA et al., 1998; BRAZ et al., 2002; MAALEJ et al., 2003; KURKJIAN et al., 2005; MACHADO DE ASSIS et al., 2008 e 2012; PEDRAS et al., 2008; MOHAPATRA et al., 2010; VAISH et al., 2012; COSTA et al., 2012; ABASS et al., 2013; 2015). Em uma metanálise, a sensibilidade e especificidade do ELISA rK39 foram estimadas em 92% e 81%, respectivamente (MAIA et al., 2012).

Nos anos que se seguiram, dezenas de estudos também foram publicados avaliando o antígeno rK39 em plataformas imunocromatográficas (SUNDAR et al., 1998; JELINEK et al., 1999; BERN et al., 2000; ZIJLSTRA et al., 2001; DELGADO et al., 2001; SCHALLIG et al., 2002; SUNDAR et al., 2002; BRANDONÍSIO et al., 2002; GOWAMI et al., 2003; CARVALHO et al., 2003; SARKER et al., 2003; CHAPPUIS et al., 2003; VEEKEN et al., 2003; BOELAERT et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2005; MATHUR et al., 2005; SUNDAR et al., 2006; ALBORZI et al., 2006; CHAPPUIS et al., 2006; RITMEIJER et al., 2006; DIRO et al., 2007; SUNDAR et al., 2007; TAKAGI et al., 2007; MACHADO DE ASSIS et al., 2008; BOELAERT et al., 2008; SAGHROUNI et al., 2008; MANDAL et al., 2008; AMATO NETO et al., 2009; SINGH et al., 2010; TERÁN-ÁNGEL et al., 2010; KHAN et al., 2010; ABASS et al., 2011; CAÑAVATE et al., 2011; KHAN et al., 2011; MACHADO DE ASSIS et al., 2012; EL-MOAMLY et al., 2012; MATLASHEWSKI et al., 2013; MOLINET et al., 2013; BOELAERT et al., 2014; BARBOSA-JÚNIOR et al., 2015). Em uma metanálise que incluiu 13 estudos, Chappuis et al. (2006) estimaram a sensibilidade e especificidade do teste rápido com rK39 em 93,9% e 90,6%, respectivamente.

Em 2007 a empresa InBios International Inc. dos Estados Unidos depositou nos Estados Unidos, WIPO e Canadá o pedido de patente US20100330585A, solicitando proteção para o sistema de fluxo lateral, útil no diagnóstico rápido das leishmanioses, doença de Chagas e sífilis. O sistema de fluxo lateral protegido se diferencia do sistema convencional por não necessitar de um suporte sólido para o conjugado, neste caso, o conjugado é usado em uma formulação líquida e aplicado ao dispositivo após a aplicação da amostra biológica e a solução tampão de corrida. A modificação no método possibilita simplificar a produção dos kits e consequentemente redução nos custos, uma vez que não utilizará o suporte sólido do conjugado como nos métodos convencionais. O sistema descrito nesta patente é utilizado no teste rápido Kalazar Detect™ produzido pela InBios International Inc dos Estados Unidos.

O grande número de publicações relacionadas aos testes imunocromatográficos rápidos foi acompanhado e certamente ocasionado pela padronização e disponibilização comercial de testes por várias empresas. Entretanto, estes apresentavam resultados variáveis dependendo da região geográfica, do produto e da metodologia empregada. Diante dos diversos produtos disponíveis no mercado, a OMS (2011) realizou um estudo multicêntrico em três regiões endêmicas: oeste da África (Sudão e Kênia), América do Sul (Brasil) e subcontinente indiano (Índia, Nepal e Bangladesh), avaliando diversas características de cinco testes rápidos (Crystal® KA produzido por Span Diagnostics Ltd/Índia, DiaMed-IT LEISH® produzido por Bio-Rad Laboratories/EUA, Kalazar Detect™ produzido por InBios

International Inc/EUA, Signal® - KA produzido Span Diagnostics Ltd/Índia, Onsite Leishmania Ab Rapid produzido por CTK Biotech. Inc/EUA.)

Com relação ao desempenho, a sensibilidade e a especificidade dos cinco testes avaliados variaram de 61,5% a 92% e 95,6 a 98,8%, respectivamente, na América do Sul, 36,8% a 87,2% e 90,8% a 98,0%, respectivamente, no oeste da África e 92,8% a 100% e 96% a 100%, respectivamente, no subcontinente indiano. Na América do Sul, o IT LEISH® foi o que apresentou maior sensibilidade (92 %) e o Signal® – KA maior especificidade (98,8%). Segundo os autores, de um modo geral os cinco testes avaliados apresentaram bom desempenho e boa reprodutibilidade. Entretanto, apontaram como limitação do estudo as amostras terem sido coletadas retrospectivamente.

Em 2008, o Instituto de Pesquisas em Doenças Infecciosas de Seattle do estado de Washington nos Estados Unidos realizou o depósito US20150017200A1, que se refere à fusão de polipeptídeos antigênicos isolados de *L. donovani* a serem utilizados no diagnóstico da LV humana e canina. Esta fusão compreendeu associações entre os antígenos K26, K39 e K9 ou de suas porções imunogênicas. No relatório descritivo é apresentada a construção de um gene sintético, chamado de K28, contendo sequências parciais de DNA dos antígenos K26 e K39 e a sequência completa do K9. O objetivo da fusão foi melhorar o potencial diagnóstico de cada uma das proteínas, com consequente aumento da sensibilidade do teste diagnóstico e redução de custo.

Os inventores relataram sensibilidade de 94% quando o K28 foi avaliado por ELISA em soros de 52 indivíduos venezuelanos com sinais clínicos e sorologia positiva (IFAT ou hemaglutinação indireta) para LV. Posteriormente, o K28 e o K39 foram avaliados em uma plataforma imunocromatográfica dupla, apresentando 88,4%, e 95,6% de sensibilidade, respectivamente. O teste imunocromatográfico rápido OL Leishmaniose Visceral Humana, desenvolvido pela empresa ORANGELFE COMÉRCIO E INDÚSTRIA LTDA faz uso do rK28 sintético protegido pela patente US20150017200A1 e possui registro vigente na ANVISA, porém, este não está disponível comercialmente.

Em 2012, um depósito brasileiro (BR102012032499A2) feito pelo Instituto de Ciências Biológicas do Departamento de Parasitologia da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais foi registrado no INPI. Este descreve um novo processo de expressão da porção heteróloga repetitiva da cinesina, construindo um antígeno recombinante da proteína K39 associado a uma sequência repetitiva degenerada chamada de KDDR (*Kinesín Degenerated Derived Repeat*).

No Brasil, um teste rápido utilizando o rK39 (Kala-Azar Detect™) aplicado ao diagnóstico da LV humana foi inicialmente avaliado por Carvalho et al. em 2003 em 128 pacientes com LV confirmados por exame parasitológico. Como controles foram incluídos soros de 10 indivíduos saudáveis e de 50 pacientes portadores de outras infecções. A sensibilidade do Kala-Azar Detect™ e do ELISA utilizando antígeno bruto de parasito foi de 90% e 89% respectivamente, enquanto a especificidade foi de 100% e 98 %, respectivamente. Os autores ressaltaram que o Kala-Azar Detect™ é um teste diagnóstico útil que apresenta elevada especificidade, entretanto, relataram que uma limitação do estudo foi o número pequeno de controles avaliados.

Posteriormente, Machado de Assis et al. (2008) validaram o teste rápido IT LEISH® em 213 casos de LV confirmados parasitologicamente e 119 controles (indivíduos com a clínica sugestiva, parasitológico negativo e com confirmação de outra etiologia), observando sensibilidade de 93% e especificidade de 97%. Os resultados obtidos permitiram recomendar o IT LEISH® para diagnóstico rápido da LV no país, com o devido acompanhamento da sua implantação nos serviços de saúde para avaliar o seu desempenho em condições de uso rotineiro.

Em outro estudo realizado no Brasil, Amato Neto et al. (2009) avaliaram o desempenho do IT LEISH® em 30 casos de LV e 110 controles (indivíduos saudáveis e portadores de outras doenças), observando 100% de sensibilidade e 96-100% de especificidade. Já Molinet et al. (2013) relataram 100% de especificidade quando o Kala-Azar Detect™ foi avaliado em 272 amostras de pacientes com LCL.

Durante o ano de 2009 o Ministério da Saúde adquiriu 12.000 kits Kala-Azar Detect™ e os disponibilizou em 2010 a laboratórios de referência (Mauro Arruda, Ministério da Saúde, informação pessoal), além disso, solicitou ao Centro de Referência em Leishmanioses (CRL) do CPqRR a avaliação do teste comprado, utilizando as mesmas amostras utilizadas para o estudo de validação do IT LEISH® (Machado de Assis et al., 2008). Nesta avaliação, o Kala-Azar Detect™ apresentou 88,1% de sensibilidade e 90,6% de especificidade (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2012).

Em 2013, Moura et al. avaliaram o desempenho do Kalazar-Detect™, realizado em 11 unidades de saúde de Belo Horizonte, Minas Gerais, em 476 casos suspeitos de LV, sendo 145 confirmados pelo SINAN. A sensibilidade estimada foi de 72,4% e a especificidade de 99,6%. A partir dos dados obtidos os autores ressaltaram que o teste é altamente específico, porém apresenta sensibilidade moderada.

Em 2014 o MS publicou a Nota Informativa nº 29 de 2014 (CGDT/Devit/ SVS-MS) informando a substituição do Kalazar-Detect™ pelo IT LEISH® e em 2015, o IT LEISH® foi disponibilizado a todos os Lacens do país. Na ocasião, o MS adquiriu via OPAS 1.331 kits (com 24 testes cada) ao valor final de US$444.320,25. Assim, o custo de uma reação de teste rápido IT LEISH® foi de US$ 13,90.

Machado de Assis et al. (2015) descreveram o processo e os custos da implantação de dois testes, IT LEISH® e DAT-LPC, para descentralizar o diagnóstico da LV em Ribeirão das Neves, Minas Gerais. No trabalho, os autores também estimaram o custo direto destes testes comparado a outros disponíveis no país. O custo direto relacionado a cada profissional de saúde capacitado na realização do IT LEISH® foi de R$ 15,75 e na realização do DAT-LPC, de R$ 21,94. O custo direto do IT LEISH® e do DAT-LPC foi estimado em R$ 14,63 e R$ 12,02, respectivamente. Neste estudo o custo direto do Kalazar-Detect™ e da RIFI foi estimado em R$ 14,85 e R$ 27,71, respectivamente. Esta avaliação apontou para a viabilidade da descentralização do IT LEISH® e DAT-LPC, métodos que aumentam o acesso ao diagnóstico no Brasil.

Recentemente, a aceitação dos métodos IT LEISH® e DAT-LPC pelos pacientes e profissionais de saúde foi avaliada no Brasil por Machado de Assis et al. (2016). O estudo foi realizado através de questionários aplicados a 92 pacientes e 47 profissionais de saúde da cidade de Ribeirão das Neves, Minas Gerais. De acordo com a opinião dos pacientes, 96% consideram a punção digital uma característica positiva do teste e 98% manifestaram confiança em seu resultado. Os profissionais de saúde também demonstraram grau elevado de aceitação do IT LEISH® e DAT-LPC, visto que, mais de 85% relataram confiança nos resultados, classificando a execução da técnica e interpretação como fáceis.

Atualmente, o IT LEISH® encontra-se registrado na ANVISA com período de vigência até 2020, já o registro do Kalazar-Detect™ venceu em 2010 (ANVISA, 2016); nenhuns dos dois testes são produzidos no Brasil. A vigência do primeiro depósito, DE69417541T2 apresentado pela Corixa Corporation, usando o K39 aplicado ao diagnóstico se encerrou em 2013, caindo em domínio público após vinte anos do depósito prioritário. Esse fato abre possibilidade de padronização e produção nacional de testes diagnósticos utilizando este antígeno.

6 DISCUSSÃO

A elevada letalidade da LV tem sido em parte atribuída à demora no diagnóstico e início do tratamento. A falta de métodos adequados e que facilitem o acesso é também um grave problema para atenção adequada aos portadores de LT. Para ambas as formas clínicas da doença, não estão disponíveis métodos diagnósticos simples e de alto desempenho e muito menos medicamentos seguros e eficazes. Os serviços públicos e privados de atenção à saúde têm encontrado dificuldade de prestar assistência eficiente a estes pacientes.

É urgente a necessidade de métodos diagnósticos confiáveis e simples, que possam ser executados em beira de leito e localidades distantes dos grandes centros. Entretanto, é escasso o desenvolvimento tecnológico para as leishmanioses e mais raro, o desenvolvimento consistente e que resulte em produto no mercado. O tamanho do desafio para fortalecer e garantir qualidade da atenção ao portador de LV fica claro por alguns dados do Datasus e da ANVISA sobre a situação do diagnóstico da doença no Brasil, analisados nos Estudos Estratégicos para Inovação e Desenvolvimento Tecnológico em Diagnóstico e Terapêutica de Doenças Negligenciadas Relatório 1: Leishmaniose Visceral (CPqRR/FIOCRUZ, 2016):

- Zonas rurais têm maior incidência anual do que zonas urbanas;
- As taxas de mortalidade por LV, padronizadas por idade, foram maiores e iguais nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste;
- As cinco UFs com maiores taxas de mortalidade pela doença são Tocantins, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Piauí e Ceará;
- De 2007 a 2012, 13% dos pacientes receberam tratamento por diagnóstico clínico-epidemiológico, sem confirmação laboratorial e, em 39,3% dos casos notificados, o diagnóstico foi obtido por punção de medula óssea (parasitológico). Os exames utilizados apresentaram desempenho insuficiente, com sensibilidade de 78,6% para o diagnóstico parasitológico e de 87% para os testes imunológicos;
- Em média, 5,3% dos casos novos eram coinfectados pelo HIV. Essa proporção apresentou variação ao longo do período, com aumento de 170% entre 2007 e 2012;
- Neste período, a taxa de letalidade manteve-se com média inalterada de 6%;
- No Brasil há uma divisão de mercado, sendo que os laboratórios públicos utilizam em sua rotina os testes fornecidos pelos órgãos de governo (IFI-Biomanguinhos e testes rápidos) e os laboratórios de análises clínicas privados utilizam, principalmente, plataformas ELISA;

- O único produto com suficiência de produção nacional (RIFI-Bimanguinhos) tem desempenho diagnóstico insuficiente e limita acesso, retardando o início do tratamento;
- O Brasil depende de importação de *kits* para disponibilizar testes com desempenho suficiente e com maior possibilidade de acesso;
- O primeiro teste rápido disponibilizado no país, de 2009 a 2014, que possui registro vencido na ANVISA desde 2010, requer coleta de sangue venoso e teve distribuição centralizada em hospitais e laboratórios de referência. Não havia sido validado no país quando iniciado e as avaliações posteriores mostraram desempenho moderado;
- Os preços de compra direta dos kits de diagnósticos comercializados por empresas no Brasil variam de aproximadamente R$6,00 a R$12,00.

Da mesma forma, o desafio para a adequada atenção ao portador de LT, está destacada nos Estudos Estratégicos para Inovação e Desenvolvimento Tecnológico em Diagnóstico e Terapêutica de Doenças Negligenciadas Relatório 2: Leishmaniose Tegumentar (CPqRR/FIOCRUZ, 2016):

- As maiores taxas de incidência anual ocorrem em adultos entre 20 e 59 anos e as zonas rurais têm maior incidência anual do que zonas urbanas;
- Populações indígenas e indivíduos pardos têm a maior taxa de incidência no país;
- As cinco UFs com as maiores taxas de incidência são: Acre, Roraima, Amapá, Mato Grosso e Rondônia, sendo que o Acre apresentou a maior taxa;
- De 2007 a 2012, 83,8% dos pacientes receberam tratamento por diagnóstico clínico-laboratorial e 16,2% apenas com diagnóstico clínico-epidemiológico;
- O Antígeno de Montenegro, deixou de ser produzido pelo CPPI, no Paraná, em 2016 levando ao desabastecimento da rede pública;
- O arsenal diagnóstico disponível no país é majoritariamente composto por testes sorológicos, desenvolvidos para o diagnóstico da LV e usados para o diagnóstico da LT. A exceção é o kit ELISA *Leishmania* Cutânea IgG CELISA, específico para LC. Nenhum deles tem estudos de validação e não estão disponíveis informações sobre seu desempenho;
- O diagnóstico parasitológico direto pode ser realizado através de escarificação, que tem sensibilidade menor ou biópsia de lesão, que é um procedimento mais invasivo e realizado por médico. Os métodos de cultura de *Leishmania* spp., quando disponíveis podem aumentar a baixa sensibilidade do exame direto, mas estão restritos aos Centros

de Referência, sendo raramente usados na prática clínica e requerem semanas para liberação dos resultados;

- Não existem *kits* de diagnóstico molecular registrados no Brasil e o uso das técnicas moleculares "*in house*" para diagnóstico, isolamento e caracterização das espécies está restrito aos Centros de Referência;
- Não há estudos de custo-efetividade relacionados a diagnóstico da LC realizados no Brasil.

O reconhecimento do déficit econômico do Complexo Industrial da Saúde no Brasil e da dependência de importação têm favorecido a indução de inovação no país, mas seus efeitos ainda não trouxeram repercussão para o diagnóstico das leishmanioses.

Por outro lado, o último século se caracterizou por avanços expressivos em tecnologias voltadas para o mercado da saúde, no âmbito global. Ao mesmo tempo, levantou significativo debate sobre o fortalecimento da indústria farmacêutica e a imposição de barreiras ao acesso a tecnologias mais eficazes, especialmente por países pobres, cuja maior parte da população não pode arcar com gastos significativos em saúde e, portanto, não representa mercado atrativo (VIDOTTI & CASTRO, 2009).

As evoluções tecnológicas impulsionaram investimentos significativos em C&T e com estes, surgiu a necessidade de instrumentos formais que pudessem garantir proteção a propriedade intelectual (SABINO, 2007). Neste contexto, o sistema de patentes conquistou importância estratégica, pois possibilitou ao inventor o direito exclusivo de propriedade, ainda que por um período determinado (CHAVES et al., 2007).

Segundo Ferrreira et al. (2009) para as empresas do setor farmacêutico, o sistema de patentes é um mecanismo vital para estimular a inovação, pois garante lucros necessários para compensar seus investimentos em P&D. Neste cenário, o regime de patentes representa importante fonte de inovação, estimulando a atividade empreendedora e competição. Em contraponto, este sistema pouco favorece as populações afetadas pelas DTNs, pois criam monopólios, representados pelo direito de exclusividade de produção e venda da patente (VIDOTTI & CASTRO, 2009), dificultando o acesso das populações empobrecidas a novas tecnologias (DECIT, 2010; DNDi, 2014). No geral, a indústria tende a definir sua estratégia de ação e investimento a partir da lógica de mercado, que busca o lucro e o retorno financeiro, que dificilmente seria alcançado, se fossem priorizadas as necessidades das populações afetadas pelas DTNs (HOTEZ, 2007; WERNECK et al., 2011).

O Brasil se destaca no contexto global da indústria farmacêutica, representando um mercado dinâmico que apresenta taxas de crescimento significativas, desde 2004. Este

mercado aquecido é representado principalmente por produtos relacionados ao câncer, as doenças respiratórias, cardiovasculares, imunes e mentais (VIDOTTI & CASTRO, 2009). Sabe-se que o investimento em P&D para DTNs é pouco representativo quando comparado ao empregado às necessidades das populações residentes em países desenvolvidos e que o conhecimento produzido não tem sido revertido em avanços terapêuticos significativos (DECIT, 2010), isto porque o esforço em P&D para estas doenças poderia causar prejuízo à indústria, tendo em vista que, produtos patenteados com este foco poderiam ser alvo de licenciamento compulsório, uma flexibilidade prevista no acordo TRIPs e, portanto, representariam uma ameaça ao retorno financeiro esperado (VIDOTTI & CASTRO, 2009).

Seguindo padrão já mencionado para as DTNs, poucos avanços também foram observados no diagnóstico das leishmanioses, um grupo de doenças que representa sério impasse ao desenvolvimento social e econômico das populações afetadas. Estudos relacionados ao desenvolvimento tecnológico das leishmanioses são escassos, porém, essenciais para orientar o investimento e estabelecer prioridades. Em 2015, Carvalho et al. estudaram o panorama mundial das patentes publicadas entre 2008 e 2012 com foco em leishmanioses. O estudo identificou 132 patentes relacionadas a diagnóstico, tratamento, profilaxia e combate ao vetor, destas, 14 eram voltadas para o diagnóstico humano ou canino. Os autores destacaram a existência de alguns investimentos para as demandas técnicas ainda não atendidas no campo das leishmanioses e que esperam em médio prazo a disponibilização de algumas das inovações identificadas aos pacientes.

6.1 O Panoroma da Proteção Intelectual Relacionada ao Diagnósticos das Leishmanioses

No presente estudo, a estratégia de busca utilizada resgatou 787 documentos, destes apenas 22% (170 patentes) apresentavam prova de conceito em seu relatório descritivo. Pequeno número de patentes apresentando prova de conceito para tratamento 728/7075 (10%) também foi observado quando Monzote (2011), avaliou os avanços tecnológicos relacionados a drogas leishmanicidas. Este fato chama a atenção para uma característica comum dos detentores, que é tentar reivindicar proteção para o maior número de usos e doenças possíveis, mesmo que a invenção não tenha sido ainda avaliada para todas as finalidades reivindicadas.

Quando se analisou os 17 depósitos que apresentaram prova de conceito para o diagnóstico das leishmanioses e dois depósitos com prova de conceito para diagnóstico e/ou tratamento, observou-se certa especificidade no objetivo do registro, visto que, a maioria deles (79% - 15/19) reivindicou proteção somente para as leishmanioses. Vale ressaltar que muitos

documentos apresentavam provas de conceito pouco claras, com número limitado de amostras biológicas, uso de testes referência inapropriados e conclusões não fundamentadas nos resultados dos experimentos. Este fato pode ser explicado pela flexibilidade dos exemplos ilustrativos em experimentos de prova de conceito a serem apresentados em relatórios descritivos de patentes. Os resultados experimentais são ferramentas para confirmar a utilidade da invenção descrita, no entanto, a demonstração ou não desses resultados não é um fator decisivo para se obter a concessão da patente. As vantagens divulgadas pela invenção passam, na prática, por uma crítica mais aprofundada do que a autenticidade das provas de conceito apresentadas. Essa crítica ocorre quando a invenção é avaliada para utilização e/ou comercialização, por terceiros, do conceito inventivo descrito no pedido de patente. Nessa ocasião, a não confirmação das vantagens descritas pela invenção pode resultar na inutilidade do documento (DIAS & ALMEIDA, 2013).

A análise da evolução temporal mostrou que é irregular e pequeno o número de depósitos realizados entre 2013 e 2015, sendo o maior número observado, 2 depósitos por ano. Limitado número de novas tecnologias relacionadas ao diagnóstico das leishmanioses (11) também foi observado nos artigos resgatados na literatura científica, sendo os maiores números de artigos publicados em 2010 e 2013, com quatro e cinco artigos publicados, respectivamente. Este achado reflete o desinteresse por P&D relacionada ao diagnóstico das DTNs, incluindo as leishmanioses.

Os institutos de pesquisa, com 26% (5/19) dos depósitos realizados, se destacaram como os principais detentores das patentes relacionadas ao diagnóstico das leishmanioses. Este achado também foi observado por Carvalho et al., 2015 no estudo de patentes para leishmanioses e por Machado da Silva et al. (2015), avaliando novas perspectivas para a quimioterapia para leishmaniose em patentes. Salles-Filho e Bonacelli (2005) consideram que, juntamente com as universidades, os institutos de pesquisas são atores importantes para a produção, difusão, transformação e avanço do conhecimento científico e tecnológico.

Entre os institutos depositantes, merece destaque a FIOCRUZ, centro de pesquisa vinculado ao MS do Brasil, reconhecida como uma das mais destacadas instituições de ciência e tecnologia em saúde da América Latina. A FIOCRUZ possui uma complexa e abrangente organização com atuação em pesquisa e ensino nas áreas: biomédica, saúde pública, desenvolvimento tecnológico e produção de insumos para a saúde, controle de qualidade, prestação de serviços de referência e informação em saúde (FIOCRUZ, 2016).

As organizações sem fins lucrativos e as empresas contribuíram igualmente para o total de patentes depositadas, com quatro depósitos cada, assim como as universidades e

parcerias públicas, com três depósitos cada. No Brasil, o número de empresas que desenvolve inovações é reduzido, principalmente se compararmos com o padrão internacional (SALERNO & KUBOTA, 2008). Machado da Silva et al. (2015) ao revisarem entre 1994 e 2014 os depósitos relacionados a novos medicamentos para as leishmanioses destacaram que a maioria das patentes para medicamentos depositadas no período não foram produzidas pela indústria farmacêutica, mas sim por institutos de pesquisa públicos ou por universidades.

Um dos principais determinantes do aproveitamento da geração de conhecimento nas instituições acadêmicas pela indústria é o fluxo da informação científica e tecnológica. Ao analisar a relação entre universidade, indústria e governo na América Latina, Sutz (2000) mostrou que, em países com sistema industrial frágil, os principais atores nas atividades de P&D são as instituições do setor público, representadas pelas empresas sem fins lucrativos, institutos de pesquisas ou universidades. Etzkowitz e Leydesdorff (2000) afirmam que as universidades possuem capacidade para desempenhar um importante papel com relação ao desenvolvimento da inovação, pois acompanham os processos de mudança e estabelecem a interação entre o conhecimento, a estratégia de desenvolvimento e os recursos humanos capacitados.

A fraca interação entre as instituições de ensino e/ou pesquisa com as empresas pode ser um dos fatores que limitam a capacidade de gerar inovação no Brasil. Além de gerar mais renda, as atividades de P&D em uma empresa promovem adaptação às demandas e aumentam as suas chances de conquistar maiores espaços no mercado (CALMANOVICI, 2011).

Em países em desenvolvimento, os problemas enfrentados para o estabelecimento de cooperação efetiva entre essas instituições estão relacionados à falta de estrutura eficaz para definir os direitos de propriedade, burocracia para estabelecer direitos entre as parcerias, questões contratuais, financiamentos insuficientes, diferenças de normas da universidade e indústria em termos de atividades de P&D a curto e longo prazo (JASINSKI, 1997; SUTZ, 2000; CYSNE, 2005). A partir dos recentes marcos legais conquistados, o Brasil tem proporcionado um ambiente favorável para a mudança desse cenário e maior participação das empresas na pesquisa. Neste arcabouço das principais iniciativas, pode-se destacar os incentivos e apoio à inovação às empresas proporcionados na Lei da Inovação (Lei nº 10.973/2004), Lei do Bem (Lei nº 11.196/2005) e também as oportunidades e estímulos pelo PNI.

A análise da distribuição dos depósitos de patentes por país ou escritório depositado mostrou que a maioria foi realizado via PCT na OMPI. Os depósitos realizados por PCT permitem requerer a proteção patentária de uma invenção simultaneamente em todos 148

países signatários através de um único depósito internacional. As vantagens de se depositar na OMPI são a agilidade, simplicidade do processo e a economia de custos. Após 18 meses considerados como período de sigilo e análise do depósito internacional, o requerente tem até 30 meses para entrar na fase nacional dos países signatários. Essa fase é facilitada pelo relatório de pesquisa internacional, pela opinião escrita segundo o PCT, e ainda pelo relatório preliminar internacional sobre a patenteabilidade. (INPI, 2015). Os Estados Unidos e a Organização Européia de Patentes, também se destacaram como fortes potências em inovação, recebendo expressivo número de depósitos. No contexto dos depósitos relacionados ao diagnóstico das leishmanioses, o Brasil ocupou a quinta posição, recebendo seis depósitos. Chama a atenção que, dos depósitos realizados no Brasil, apenas dois tenha sido realizado por instituição nacional.

Quanto à distribuição dos pedidos segundo o país do depositante, observou-se predominância de instituições dos Estados Unidos, com nove depósitos, seguido pela França e Índia com três depósitos cada. Nove empresas transnacionais, todas com sede nos Estados Unidos, controlam 80% do mercado farmacêutico nacional brasileiro (COSTA-COUTO & NASCIMENTO, 2008). Empresas nos Estados Unidos, na Ásia e na Europa utilizam cada vez mais patentes como instrumento estratégico de importância fundamental em suas atividades competitivas no mundo globalizado, tais como: desenvolvimento de novas tecnologias, monitoramento de concorrentes, identificação de tendências tecnológicas e investimentos (INPI, 2016b). A participação de instituições nacionais foi muito pequena no período de estudo, com dois depósitos realizados pela FIOCRUZ. A participação irrisória do Brasil pode ser reflexo de dois pontos importantes. Primeiro, as leishmanioses não são atrativas à indústria farmacêutica, pois são pouco rentáveis. Segundo, pela insuficiência do processo de P&D no país, não atrelado às políticas públicas e não direcionado pelas necessidades.

Quanto à estratificação por método de diagnóstico, o maior número de depósitos foi solicitado para a detecção de anticorpos, seguido de detecção de antígenos. Este resultado corrobora com Carvalho et al. (2015), que mostraram que a grande maioria das patentes está voltada para a aplicação diagnóstica de polipeptídeos, genes ou anticorpos específicos, recombinantes ou não, baseados em antígenos ou proteínas de *Leishmania* para serem utilizados em imunoensaios. Uma justificativa para o expressivo número de depósitos protegendo moléculas com potencial para uso no diagnóstico é que estas também são avaliadas para uso em produção de composições vacinais. A partir da década de 90 observa-se um crescimento e maior esforço para a obtenção de vacinas conjugadas quimicamente, de vacinas combinadas de antígenos obtidos por engenharia genética e outras formas de

aplicação. Baseado nestes avanços e no potencial para aplicação das novas tecnologias, as empresas farmacêuticas identificaram o setor de vacinas como uma oportunidade de mercado atrativo (GADELHA et al., 2003).

No geral, 53% (10) dos depósitos de patentes que mostraram aplicação para diagnóstico foram abandonados, sendo que todos não apresentaram desenvolvimento adicional. A principal causa observada nos sites dos escritórios pesquisados para o status destes depósitos foi a falta de pagamento de taxas de manutenção. Portanto, é possível inferir que estas não apresentam potencial para desenvolvimento de produto em curto ou médio prazo. Os custos de uma patente não são apenas durante o seu desenvolvimento: ao finalizar a tecnologia, o inventor ainda tem custos com as taxas de depósito do pedido de patente, publicação antecipada, pedido de exame de invenção, anuidades de pedido, expedição de carta patente e anuidades de patente.

De acordo com a tabela de retribuições dos serviços prestados pelo INPI, o custo inicial para realizar um pedido de patente de invenção é R$1.455,00, além das taxas de anuidades que variam de R$780,00 a R$2.005,00 conforme o ano de vigência. Esses valores não incluem taxas administrativas em decorrência de obstáculos processuais como exigências, subsídios ao exame ou restaurações realizadas após o pedido (INPI, 2015). Para pedidos via PCT requerentes geralmente pagam três tipos de taxas quando registram os seus pedidos internacionais: (a) taxa de depósito internacional de R$ 4.216,00, (b) taxa de pesquisa que pode variar de cerca de R$475,5 a R$6.340,00 dependendo do escritório escolhido, e (C) taxa de transmissão, que varia de acordo com o receptor.

6.2 Potencial de Desenvolvimento e Uso dos Métodos Diagnósticos Identificados na Prospecção de Patentes e Literatura

Diagnóstico parasitológico

Ainda largamente utilizado no Brasil, tanto para o diagnóstico da LC como para o diagnóstico da LV, a busca por parasitos em fragmentos corados de lesão cutânea ou esfregaços de aspirados de medula óssea ou baço é uma técnica trabalhosa, que exige laboratorista treinado e apresenta baixa sensibilidade.

Cinco métodos que propõem avanços no diagnóstico parasitológico das leishmanioses foram identificados, sendo um pela prospecção por patentes e quatro em publicações científicas. A patente P7 protege um método de cultivo de parasitos em condições axênicas,

que tem como principal objetivo a proteção da produção de exo-antígenos. Embora se trate de cultivo de parasitos, o método tem pouca utilidade para o diagnóstico parasitológico, uma vez que o meio de cultura não foi desenvolvido para cultivo de amostras biológicas.

Três trabalhos publicados apresentam alternativas para melhorar a sensibilidade do cultivo de parasitos a partir de amostras biológicas para diagnóstico da LV e da LC. Estes métodos são utilizados em laboratórios de referência, em geral, quando os métodos de diagnóstico em lâmina não foram positivos e têm sensibilidade variável, dependendo do tempo de doença e da espécie de *Leishmania*.

A cultura microcapilar (L1) apresentou sensibilidade aumentada em comparação com os métodos tradicionais e da mesma forma o uso de cultura com diluição seriada para detectar *Leishmania* (L2) em amostras de creme leucocitário e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LV e o esfregaço de creme leucocitário de sangue periférico (L4). Entretanto, estes são métodos que tratam de aperfeiçoamento de procedimentos de alta complexidade e para os quais a produção de kits comerciais é também complexa, por serem compostos por várias etapas e vários insumos. Estes trabalhos são principalmente produções acadêmicas importantes para os serviços de referência da doença.

Já a técnica FISH (L3) de hibridização *in situ* para identificação de RNA ribossomal tem dois artigos que avaliaram protocolos para diagnóstico de *Leishmania.* Os dois trabalhos são incipientes, mas o estudo de Frickmann et al, 2012, mostra concordância de 94% com o exame direto com coloração de Giemsa, que é uma técnica de sensibilidade baixa. Se houver avanços nesta metodologia, ou estudos que comprovem maior sensibilidade, o método poderá ter utilidade restrita a laboratórios de alta complexidade, para esclarecimento diagnóstico de casos não solucionados por métodos mais simples e econômicos.

Métodos baseados na detecção de antígenos

Três métodos para detecção de antígenos foram encontrados nas buscas.

O depósito P8 é um dos dois únicos métodos identificados pela prospecção de patentes que chegaram a produtos comerciais. O teste imunocromatográfico rápido CL Detect da empresa Inbios foi desenvolvido a partir do depósito US8173383B2, que possui como detentora a própria empresa e licença concedida para o exército dos Estados Unidos. Trata-se de um teste qualitativo para a detecção de TSA de *Leishmania* presentes em lesões da pele de pacientes com LC. Em um estudo que avaliou o teste com amostras de lesões de pele em duas

áreas endêmicas de LC, os resultados do CL Detect mostraram sensibilidade de 100%. Em uma área não endêmica para LC o teste mostrou especificidade de 96% (FDA, 2014).

Embora os autores apresentem o método como um grande avanço, por ser um teste prático, rápido, de baixo custo e que não exige equipamentos especializados, persiste a necessidade de obtenção de amostras de lesão cutânea, por esfregaço ou escova. O que o teste oferece é a substituição da microscopia pela detecção do antígeno presente na amostra utilizando plataforma de fluxo lateral. Embora se mostre tecnologia promissora, o teste ainda não foi validado no Brasil.

A detecção de três peptídeos Li-isd1, Li-txn1, e Li-NTf2 produzidas por *L. infantum* tem a vantagem de utilizar amostras de urina para o diagnóstico de LV (P10). A especificidade do método foi de 100%, mas a sensibilidade, avaliada em apenas 20 amostras de portadores de LV foi baixa (89%). A baixa sensibilidade sugere que seriam necessários novos esforços para que o teste alcançasse desempenho suficiente para desenvolvimento de produto. A patente, depositada em 2008, foi abandonada em 2015. Estes peptídeos podem ter desenvolvimento com vacina, segundo publicação de Kashino et al., em 2012.

O desenvolvimento de um imunossensor para a detecção de antígenos de *L. infantum* em tecidos de hospedeiros infectados foi relatado por Cabral Miranda et al., 2014 (L5). A padronização e avaliação está em fase inicial, tendo sido utilizados apenas tecidos de animais experimentalmente infectados e os autores relatam que existe a necessidade de aumentar sensibilidade analítica da tecnologia. Não foram encontrados estudos de desenvolvimento posterior.

Dos estudos de detecção de antígeno, apenas o desenvolvimento que chegou a produto, CL Detect para diagnóstico de leishmaniose cutânea pode ser recomendado para avaliação de desempenho no Brasil, incluindo a análise de custo-efetividade.

Métodos baseados na detecção de anticorpos

O diagnóstico sorológico está bem avaliado para o diagnóstico da LV e o maior avanço comercial foi o desenvolvimento do antígeno recombinante rK39 e os investimentos que levaram à disponibilização de testes rápidos, com possibilidade de aumento de acesso a diagnóstico em locais remotos. Para LC, arsenal diagnóstico disponível no país é majoritariamente composto por testes sorológicos desenvolvidos para o diagnóstico da LV e usados para o diagnóstico da LC, sem validação em estudos populacionais no país.

A detecção de anticorpos por citometria de fluxo (P1), utilizando metodologia denominada Método Triplex (FC-Triplex-IgGl) é relacionada ao depósito US20150057174A1, realizado pela FIOCRUZ, em 2012. O método possibilita o diagnóstico diferencial de três doenças, LV, LC e doença de Chagas, permitindo esclarecer os resultados duvidosos falso-positivos, frequentemente observados em testes convencionais. Entretanto, a técnica requer infraestrutura sofisticada, profissionais capacitados e apresenta elevado custo. O método é inovador e tem utilidade mais relevante para o esclarecimento de sorologias inconclusivas, já que o diagnóstico clínico das três doenças difere consideravelmente e não há dificuldade na diferenciação clínica entre LC, LV ou doença de Chagas.

Outros dois artigos científicos apresentam o desenvolvimento e a avaliação de citometria de fluxo para diagnóstico único de LT (L6) e têm as mesmas limitações mencionadas acima, pela complexidade do método. O trabalho de Rocha et al. (2003) avalia soros de 21 portadores de leishmaniose cutânea, mas previamente selecionados com RIFI positiva, o que favorece a positividade. Já no trabalho de Oliveira et al. (2013), os autores se preocuparam com a demonstração da negativação da CF após o tratamento. Neste caso, fica claro que os objetivos do desenvolvimento do método não são determinados pela necessidade de atenção ao paciente e de saúde pública. A cura clínica da lesão de LC é dada pela observação da lesão. Por outro lado, não há métodos disponíveis para o diagnóstico da LM e importante necessidade de investimentos para o diagnóstico desta forma da LT.

Treze depósitos de patentes têm como objeto o desenvolvimento de antígenos para serem usados em diferentes plataformas de detecção de anticorpos: Depósito P2 - antígeno rK28, depósito P3 - antígenos de *Leishmania*, depósito P4 - antígenos recomebinantes DD8 e KE16, depósito P5 - proteínas LinJ16.1750r2, LinJ22.1590r3, LinJ28.2310 e LinJ33 2870r1, depósito P6 - peptídeos de saliva de *L. longipalpis*, depósito P9 - Antígeno H2AP9 e P2aP6, depósito P11- antígeno LAg, depósito P12 - antígeno rK08, depósito P14 - antígeno DAT liofilizado, depósito P15 - antígenos de lisado, depósito P17 - exo-antígenos solúveis e/ou anticorpos específicos IgG e/ou IgM, depósito P18 - proteína A2 e depósito P19 - antígenos 30/36.

As invenções dos depósitos P2, P4, P5, P6 e P 12 são antígenos recombinates, que foram avaliados em pequeno número de amostras de soros de portadores de LV, com sensibilidade variando entre 97 e 99%. O depósito P9 se refere a um peptídeo sintético, com sensibilidade de 94%, em estudo com amostras de 33 pacientes com LC. Os depósitos P3, P11, P14, P15, P17, P18 e P19 são de antígenos do parasito (exoantígenos, antígenos de membrana, polipeptídeos), com sensibilidade variando de 50 a 100%. O antígeno Lag

apresentado no depósito P11 apresentou o maior desempenho, com 100% de sensibilidade e 92% de especifidade, quando se avaliou por ELISA 40 amostras de pacientes com LV e 32 amostras de controle. Entre esses depósitos, o P6 - peptídeos da saliva de *L. longipalpis* foi realizado pela FIOCRUZ em parceria com o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos. Esse depósito teve sua patente concedida, entretanto, não apresenta dados de desempenho e os esforços de desenvolvimento adicional encontrado na literatura foram para vacina.

Entre os métodos identificados, o que tem maior número de estudos e publicações é a segunda patente descrita neste trabalho que chegou a produto. O teste imunocromatográfico rápido OL Leishmaniose Visceral Humana foi desenvolvido pela empresa ORANGELFE COMÉRCIO E INDÚSTRIA LTDA a partir do depósito US20150017200A1 e faz uso do rK28 sintético. Segundo os fabricantes, o teste tem custo relativamente baixo, é de simples realização e pode ser utilizado na atenção primária, aumentando o acesso ao diagnóstico da doença. O teste possui registro na ANVISA, porém ainda não está disponível comercialmente. A empresa apenas divulga em seu portfólio online que o produto estará disponível em breve. Em contato telefônico com a empresa, um representante comercial informou que o teste não está sendo produzido por questões políticas internas da empresa e que não há previsão de produção. Se avaliado e comercializado no Brasil, o teste poderia constituir alternativa para o diagnóstico rápido da LV no país, já que os estudos realizados em outros países relatam desempenho semelhante ao teste rápido atualmente utilizado no país, o IT-LEISH®, entre 92 e 100%, dependendo da região onde o teste foi avaliado. Um novo produto no mercado facilitaria a negociação de preços.

O depósito P13 da InBios/Estados Unidos, de 2007, refere-se a um novo sistema que compreende uma formulação líquida de um conjugado indicador aplicado em dispositivo de ensaio de fluxo lateral, avaliado com prova de conceito, sem detalhamento de amostras e resultados, para o diagnóstico de LV com antígeno rK39. Segundo o depositante, esta invenção permite simplificar a produção dos kits e possibilita redução nos custos, uma vez que não utiliza o suporte sólido do conjugado como os métodos convencionais. O Kalazar Detect™ produzido pela InBios International Inc dos Estados Unidos, é um ensaio imunocromatográfico de tira que utiliza o sistema descrito na patente, no qual o conjugado é aplicado diretamente na fita.

O DAT (P14) é um teste com elevado desempenho em diversas avaliações em todo o mundo, desde sua primeira descrição, em 1975. É um teste de baixo custo, não requer equipamento e tem leitura visual. Há dois kits comerciais, um produzido pela Bélgica e outro

pela Holanda e há evidência científica suficiente do elevado desempenho de um protótipo desenvolvido no Brasil, pela FIOCRUZ. Esta é outra oportunidade de autossuficiência nacional, ainda não realizada, pela dificuldade de interações entre academia, governo e indústria.

Métodos de detecção de DNA ou RNA de Leishmania – Moleculares

Por seu elevado desempenho, as técnicas de diagnóstico molecular significaram grande avanço no diagnóstico das doenças parasitárias. Nas últimas décadas, o uso da PCR convencional foi amplamente avaliado para o diagnóstico da LV e da LT. Uma vantagem significativa é a possibilidade do diagnóstico da LV ser realizado pela amplificação do DNA do parasito em sangue periférico, eliminando a necessidade de obtenção de medula óssea para o exame parasitológico. No Brasil, não há *kits* registrados de diagnóstico molecular para as leishmanioses e o uso das técnicas moleculares "*in house*" para diagnóstico, isolamento e caracterização das espécies está restrito aos Centros de Referência.

As técnicas NASBA (L7) e LAMP (L8) foram avaliadas tanto para diagnóstico da LT, quanto da LV. A amplificação baseada na sequência de ácidos nucléicos (NASBA) e a amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP) são potentes ferramentas para desenvolvimento de produtos para o diagnóstico das leishmanioses, pois apresentaram bom desempenho. O LAMP apresenta ainda a vantagem de não requerer termociclador e da interpretação visual dos resultados, sendo uma alternativa para o diagnóstico molecular em áreas remotas. A disponibilidade de kits comerciais de LAMP para leishmaniose, a exemplo dos kits disponíveis para tuberculose, malária e tripanossomíase africana seria altamente desejável. Para a implantação dos testes no Brasil seriam necessários estudos de custo-efetividade.

Além das duas técnicas mencionadas acima, o uso de biossensores (L10) e a qPCR (L11) também se apresentam como alternativas de diagnóstico, descritas na literatura. Mohan et al. (2011) avaliando biossensores eletroquímicos na detecção de DNA para diagnóstico da LV mostrou resultados iniciais promissores. No entanto, novos estudos são necessários com utilização de amostras clínicas para a avaliação do seu desempenho diagnóstico.

A qPCR (L11) foi avaliada por diversos protocolos, com altos índices de acurácia diagnóstica, utilizando diferentes alvos. Os resultados têm sido promissores, mas, o custo do teste e a exigência de infraestrutura e profissional qualificado representam obstáculos na utilização dos mesmos para o diagnóstico da doença. Além destas limitações, existe apenas

um kit comercial de qPCR (Stat-Nat *Leishmania* spp.), nunca avaliado no Brasil. Chama a atenção a grande quantidade de protocolos de qPCR desenvolvidos pela academia e a escassez de kits comerciais para o diagnóstico da doença.

O teste rápido *Leishmania* OligoC-Test (L9), produzido pela empresa Belga, Coris BioConcept, teve um estudo com pequeno número de casos (56 pacientes portadores de LC) com sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. Da mesma forma que o CL-Detect, mantém-se a necessidade de obtenção de amostras de lesão cutânea, que dificulta a utilização do método por unidades de atenção básica. Pela proposta de ser um teste rápido e simples, a avaliação deste teste no Brasil representa oportunidade de curto prazo, mas o estudo de desempenho deve ser acompanhado de avaliação de custo-efetividade.

7 CONCLUSÕES

O desenvolvimento tecnonlógico voltado ao diagnóstico das leishmanioses, entre 2003 e 2015 foi limitado em termos numéricos e em termos de alcance de mercado e uso em saúde pública. Poucos métodos de diagnóstico descritos na literatura científica ou com pedido de proteção intelectual ultrapassaram a fase de prova de conceito ou de avaliação com número limitado de amostras biológicas. No Brasil, apenas uma nova tecnologia, o teste rápido para LV foi incorporado pelo SUS, em mais de 50 anos. Estudos relacionados à inovação tecnológica são escassos, portanto, investimentos em estudos de prospecção tecnologica tornam-se necessários para identificar tecnologias promissoras, estabelecer prioridades e políticas públicas efetivas.

Dois métodos para detecção de anticorpos têm potencial para produção nacional imediata: os testes rápidos que utilizam antígeno rK39 e o teste de DAT.

A padronização de técnicas de amplificação isotérmica de DNA abre novas perspectivas de uso de técnicas moleculares que apresentam elevado desempenho em serviços de atenção primária de saúde, desde que se mostrem custo-efetivas.

Os investimentos e as invenções tecnológicas ainda são insuficientes para atender as demandas e dar qualidade e eficiência à atenção ao paciente e ao controle das leishmanioses. É necessária a coordenação estratégica do desenvolvimento tecnológico e das parcerias entre instituições tecnológicas, universidades e indústria, dirigidas às necessidades de saúde pública do país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASS, E et al. rKLO8, a novel Leishmania donovani–derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. e2322. 2013.

_____ et al. Validation of a [Beta]-ME ELISA for Detection of Anti Leishmania donovani Antibodies in Eastern Sudan. **Iranian Journal of Immunology**, v. 8, n. 3, p. 150. 2011.

_____ et al. Heterogeneity of Leishmania donovani parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0116408, 2015.

ABDI. AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. Brasil maior. Disponível em: <http://www.abdi.com.br/>. Acesso em: 22 jun. 2016.

ABEIJON C et al. Identification and diagnostic utility of *Leishmania infantum* proteins found in urine samples from patients with visceral leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, 19: 935–943, 2012.

ADAMS ER et al. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** 82(4):591–596, 2010.

_____ et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. **Parasitology**, 141 (14): 1891-7, 2014.

ADHYA, S et al. Detection of Leishmania in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 622-624, 1995.

AKERMAN, MARCO; FISCHER, ANDRÉ. Agenda Nacional de Prioridades na Pesquisa em Saúde no Brasil (ANPPS): foco na subagenda 18–Promoção da Saúde. **Saúde e Sociedade**, v. 23, n. 1, p. 180-190, 2014.

ALBORZI A et al. Evaluation of rK39 strip test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in infants. **East Mediterr Health Journal**, 12(3-4):294-9, 2006.

ALBUQUERQUE EM. Sistema nacional de inovação no Brasil: uma análise introdutória a partir de dados disponíveis sobre a ciência e a tecnologia. **Revista de Economia Política**, 16:56-72, 1996.

ALLAHVERDIYEV AM. et al. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 3, p. 294-297, 2004.

_____ et al. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 73: 276-280, 2005.

ALLAIN DS, KAGAN IG. A direct agglutination test for leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 24(2):232-6, 1975.

ALTES J et al. Visceral leishmaniasis: another HIV-associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of the literature. **Aids**, 5(2):201-7, 1991.

ALVAR J et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**,10(2):298-319, 1997

_____, YACTAYO S, BERN C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in parasitology**,22(12): 552-557, 2006.

_____. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7(5): 1-12, 2012.

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.

AMPARO, K. K. S; RIBEIRO, M. C. O; GUARIEIRO, L.L.N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 17, n. 4, p. 195-209, 2012.

ANDRESEN K et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. **Tropical Medicine & International Health**, 2:440-4, 1997.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária [online]. Brasília, Brasil; 2016. [capturado 24 maio. 2016] Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_publicados/consulta_publicados.asp.

AMATO NETO V et al. False-positive results of a rapid K39-based strip test and Chagas disease. **International Journal of Infectious Diseases**, 13(2):182-5, 2009.

BADARÓ R, REED SG, CARVALHO EM. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 32: 480-484, 1983.

_____. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.

_____. et al. Sensitivity and specificity of a recombinant Leishmania chagasi antigen in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Archives de l'Institut Pasteur de Tunis**. 70(3-4):331-2. 1993.

_____. et al. rK39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.

BAHRUTH, E. B.; ANTUNES, A. M. S.; BOMTEMPO, J. V. Gestão em Biotecnologia: Prospecção Tecnológica na Priorização de Atividades de C&T: caso Q-Trop_Tp. **Epapers**, p. 300-324, 2006.

BARBIERI, JC.; CHAMAS, CI. Acordo sobre direitos de propriedade intelectual relacionados ao comércio (TRIPs): uma revisão. In: SIMPÓSIO DE GESTÃO DA INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 24, 2006, Gramado. **Anais**. São Paulo: ANPAD. 1 CD-ROM. 2006.

BARBOSA DB. Uma introdução à propriedade intelectual**.** 2 ed. Rio de Janeiro: **Lumen Júris**, 2003.

BARBOSA-JÚNIOR WL et al. Rapid Tests and the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis and Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome Coinfection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 93(5):967-9, 2015.

BASIYE, FL. et al. Sensitivity and specificity of the Leishmania OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n. 7, p. 806-810, 2010.

BASTIEN P et al. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1897-1900, 2008.

BHATTACHARYA, S. K. et al. Elimination of leishmaniasis (kala-azar) from the Indian subcontinent is technically feasible & operationally achievable. **The Indian Journal of Medical Research**. 2006.

BERN C et al. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 63(3-4):153-7, 2000.

BEZUNEH A et al. Comparison of point-of-care tests for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in East African patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Dec;91(6):1109-15, 2014.

BOELAERT M et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 70(1):72-7, 2004.

_____ M et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 102(1):32-40, 2008.

_____ M et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, (6):CD009135, 2014.

BOSSOLASCO, S et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5080-5084, 2003.

BRANDONSIO O et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 21(6): 461464, 2002.

BRASIL. Lei 9.279 de 14 de maio 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. **Brasília**. 15 de maio de 1996; Seção 1, v.5, p. 8353.

_____. Diretrizes de política industrial, tecnológica e de comércio exterior. **Brasília**. 2003.

_____. Lei no 10.973, de 2 de dezembro de 2004. Dispõe sobre incentivos à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo e dá outras providências. Diário Oficial da União, **Brasília**, 2004.

_____. Lei nº 11.196, de 21 de novembro de 2005. Dispõe sobre incentivos fiscais para a inovação tecnológica. Diário oficial da União, **Brasília**, DF. 2005.

_____. Portaria nº 978, de 16 de maio de 2008. Dispõe sobre a lista de produtos estratégicos, no âmbito do Sistema Único de Saúde, com a finalidade de colaborar com o desenvolvimento do Complexo Industrial da Sáude e institui a Comissão para a Revisão e Atualização da referida lista. 2008.

_____. Lei no 13.243, de 11 de janeiro de 2016. Dispõe sobre estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa,à capacitação científica e tecnológica e à inovação. Diário Oficial da União, **Brasília**, 2016.

_____. Ministério da Saúde**.** Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Secretaria de Vigilância em Saúde, **Brasília**, 2010.

_____. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Brasília**, 2011.

_____. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfecção Leishmania-HIV. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Brasília**, 2011.

_____. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2ª edição atualizada. 2013.

_____. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. 1ª edição. 5ª reimpressão. **Brasília**, 2014.

BRAZ, RFS et al. The sensitivity and specificity of Leishmania chagasi recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 4, p. 344-348, 2002.

BRYCESON A. Leishmaniasis. In: Manson's tropical Diseases, 20th edition, cook, g.c. (editor). **London: W.B. Saunders**, 1213-1243, 1996.

BURNS JM Jr et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90: 7759, 1993.

CABRAL-MIRANDA G et al. Detection of parasite antigens in *leishmania infantum*–infected spleen tissue by monoclonal antibody, piezoelectric-based immunosensors. **Journal of Parasitology**, 100(1): 73–78, 2014.

CALDAS AJM et al. Infecção por *Leishmania chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís-MA, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34:445-51, 2001.

CALMANOVICI, CE. A inovação, a competitividade e a projeção mundial das empresas brasileiras. **Revista USP**, n. 89, p. 190-203. 2011.

CAMPOS-NETO A et al. Cloning and expression of a *Leishmania donovani* gene instructed by a peptide isolated from major histocompatibility complex class II molecules of infected macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, Nov1;182(5):1423-33, 1995.

_____ et al. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. **Infection And Immunity**, 69(6):4103-8, 2001.

_____ et al. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. **Infection And Immunity**, Jun;70(6):2828-36, 2002.

CAÑAVATE C et al. Evaluation of Two rK39 Dipstick Tests, Direct Agglutination Test, and Indirect Fluorescent Antibody Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in a New Epidemic Site in Highland Ethiopia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 84(1): 102-6, 2011.

CARDIM MFM et al. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil, 1999–2011. **Revista de Saúde Pública**, 47(4): 1–9, 2013.

CARVALHO, FAA et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant Leishmania donovani A2 antigen. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 4, p. 289-295, 2002.

CARVALHO SF et al. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 68: 321-324, 2003.

CARVALHO, CLC; MELLO, MM; JÚNIOR, SMA. PANORAMA MUNDIAL DE PATENTES PUBLICADAS ENTRE 2008 E 2012 COM FOCO EM LEISHMANIOSE.**Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 3, p. 459, 2015

CASSIOLATO J. E; LASTRES H. M. M. Sistemas de Inovação e Desenvolvimento – as implicações de política. **São Paulo em Perspectiva**, v. 19, nº 1. p. 34-45, 2005.

CAVALCANTE, LR. "Políticas de ciência, tecnologia e inovação no Brasil: uma análise com base nos indicadores agregados." Texto para discussão no.1458 – **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada** (IPEA). 2009.

CHAPPUIS F et al. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. **Tropical Medicine & International Health**, 8(3):277-85, 2003.

_____ et al. Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formol gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. **Journal Of Clinical Microbiology**, 43(12):5973-7, 2005.

_____ et al. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmanisis. **British Medical Journal.** 333(7571): 1-5. 2006.

CHAVES, GC et al. A evolução do sistema internacional de propriedade intelectual: proteção patentária para o setor farmacêutico e acesso a medicamentos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 2, p. 257-267, 2007.

CHIARINI, Tulio; VIEIRA, Karina Pereira. Universidades como produtoras de conhecimento para o desenvolvimento econômico: sistema superior de ensino e as políticas de CT&I. **Revista Brasileira de Economia**, v. 66, n. 1, p. 117-132, 2012.

CLINICALTRIALS.GOV. Evaluation of cl detect™ rapid test to detect cutaneous leishmaniasis. 2014. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/show/nct01865032>. Acesso em: out. 2015a.

CLINICALTRIALS.GOV. Evaluation of a rapid diagnostic device, CL detect, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in tunisia (CL detect™). 2014. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/show/nct01865032>. Acesso em: out. 2015b.

COSTA et al. Aspectos Psicossociais e Estigmatizantes Da Leishmaniose Cutâneo-Mucosa. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 20(2), p. 77-82, 1987.

_____. JML et al. Leishmania visceral no Estado do Maranhão. A evolução de uma epidemia. **Caderno de Saúde Pública**, 11:321-4, 1995.

_____. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. 79(Supl. 3):70-83, 2009.

COSTA, MM et al. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. e1622, 2012.

COSTA-COUTO M; NASCIMENTO, AC. Assimetria nas relações internacionais, propriedade industrial e medicamentos anti-aids. **Ciência e Saúde Coletiva, Rio de Janeiro**, v. 13, n. 6, 2008.

COTA GF, SOUSA MR, RABELLO A**.** Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 5 (6), 2011.

_____ et al. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**,6(5):e1665, 2012.

_____et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 89 (3): 570-577, 2013.

COTA, GF. et al. Leishmania-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2816, 2014.

COURA-VITAL W et al. Prevalence and factors associated with Leishmania infantum infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.

CRUZ I et al. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Suppl 1:S185-9, 2002.

CORIXA. **Company**. Disponível em: <http://www.coulterpharm.com/>. Acesso em: 16 mai. 2016.

CUBA, A. & CUBA et al. Diagnóstico parasitológico y inmunologico de leishmaniasis tegumentaria americana. **Boletin Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 89, n. 195-207, p. 4, 1980.

CUNNINGHAM VJ et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**. 55 (10): 1312-1319, 2012.

CUPOLILLO E et al. Genetic Polymorphism and Molecular 71 Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal Of Clinical Microbiology**, 41(7): 3126-32, 2003.

CYSNE, FP. Technology transfer between university and industry. **Revista eletrônica de biblioteconomia e ciência da informação**, n.2 54-74, 2005.

DAAR, Abdallah S. et al. Top ten biotechnologies for improving health in developing countries. **Nature genetics**, v. 32, n. 2, p. 229-232, 2002.

DA-CRUZ AM; PIRMEZ C. Leishmaniose tegumentar ameri-cana. In JR Coura, Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, **Guanabara Koogan**. p. 697-712. 2005.

DA SILVA ES et al. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. **Genetic and Molecular Research**, 3: 251257, 2004.

DA SILVA MR, STEWART J. M., COSTA C.H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 72:811-4, 2005.

DATTA, SIBNARAYAN; CHATTERJEE, SOUMYA; VEER, VIJAY. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 40, p. 14615-14625, 2014.

DE BRUJIN MHL, BARKER DC. Diagnosis of New World Leishmaniasis: specific detection of species of the *L. braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, 52: 45-58, 1992.

_____ et al. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Tropical Medicine and Parasitology**, 44(3):201-7, 1993.

DE MELLO, CX et al. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology research**, v. 109, n. 3, p. 927-933. 2011.

DECIT. Departamento de Ciência e Tecnologia Ministério da Saúde. Política Nacional de Gestão de Tecnologias em Saúde. **DECIT**. 2010.

DEGRAVE W et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania-a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994

DELGADO O et al. Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. **Parasite**, 8(4):355-7, 2001.

DE NEGRI, F.; CAVALCANTE, L. R. Sistemas de inovação e infraestrutura de pesquisa: considerações sobre o caso brasileiro. Radar – Tecnologia, Produção e Comércio Exterior, **Brasília**, n. 24, fev. 2013. Disponível em: <http://goo.gl/CCRnWI>.

DE OLIVEIRA, AP et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of immunological methods**, v. 387, n. 1, p. 245-253.2013.

DEREURE J et al. Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients in the south of France. **Bull World Health Organ**, 73(2):245-6, 1995.

DIAS, CG; ALMEIDA, RB. Scientific production and technological production: transforming a scientific paper into patent applications. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2013.

DIRO E et al. Field evaluation of FD-DAT, rK39 dipstick and KATEX (urine latex agglutination) for diagnosis of visceral leishmaniasis in northwest Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 101(9):908-14, 2007.

DISCH J et al. Detection of circulating Leishmania chagasi DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 97:391-5, 2003

_____.et al. Rapid clearance of circulating *Leishmania* kinetoplast DNA after treatment of visceral leishmaniasis. **Acta tropica**, 92 (3): 279-283, 2004.

_____. et al. *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 51:185-90, 2005.

DNDi America Latina. Centro de documentação. Descoberta: como o modelo PDP pode aperfeiçoar e acelerar o processo de P&D?. **Notícias de interesse**. 2014. Disponível em <http://www.dndial.org/pt/centro-de-documentacao/noticias-interesse/602-descoberta-viewpoint.html> Acesso em janeiro de 2015.

DPMA. DEUTSCHES PATENT- UND MARKENAMT. Patente und gebrauchsmuster. Disponível em: <http://www.dpma.de/>. Acesso em: 01 mai. 2016.

ECONOMIANET. Lei de patentes. Disponível em: <http://www.economiabr.net/>. Acesso em: 21 jun. 2016.

EL-MOAMLY A, EL-SWEIFY M, HAFEEZ M. Performance of rK39 immunochromatography and freeze-dried direct agglutination tests in the diagnosis of imported visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, 110(1):349-54, 2012.

EPO. EUROPEAN PATENT OFFICE. Patents. Disponível em: <https://www.epo.org/index.html>. Acesso em: 31 jul, 2014.

____. EUROPEAN PATENT OFFICE. Patents. Disponível em: <https://www.epo.org/index.html>. Acesso em: maio, 2016.

ESPINOSA et al., Leishmania OligoC-TesT as a Simple, Rapid, and Standardized Tool for Molecular Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Peru**. Journal of Clinical Microbiology**, 47 (8): 2560-2563, 2009.

ETZKOWITZ, H; LEYDESDORFF, L. The dynamics of innovation: from National Systems and "Mode 2" to a Triple Helix of university–industry–government relations. **Research policy**, v. 29, n. 2, p. 109-123, 2000.

FDA U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Navigate the medical devices section**. 2014. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/k141341.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2016.

FERREIRA AA, GUIMARÃES ER, CONTADOR JC. Patente como instrumento competitivo e como fonte de informação tecnológica. **Gestão e Produção**,16 (2): 209-21, 2009.

FIND. **Point of care diagnosis & treatment monitoring**. Disponível em: <http://www.finddiagnostics.org>. Acesso em: out. 2015.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz: Uma Instituição A Serviço Da Vida. **A fundação**. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br>. Acesso em: 31 mai. 2016.

FLEURY, S. Direitos sociais e restrições financeiras: escolhas trágicas sobre universalização. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 6, p. 2686-2688, 2011.

FOULET, FRANÇOISE et al. Detection and identification of Leishmania species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2110-2115, 2007.

FREIRE, Q. dos P. A importância das Bases de Busca de Patentes. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Goiás. 2010. Disponível em: www.cite.ifg.edu.br. Acesso em 25 de junho de 2016.

FRICKMANN H et al. Rapid identification of *Leishmania spp*. in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples by fluorescence in situ hybridization. **Tropical Medicine & International Health**, 17: 1117–1126, 2012.

FUCK, MP; VILHA, AM. Inovação Tecnológica: da definição à ação. **Revista Contemporâneos**, n. 9, p. 1-21, 2011.

GADELHA CAG. O complexo industrial da saúde e a necessidade de um enfoque dinâmico na economia da saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, 2:521-35, 2003.

GADELHA et al. O complexo econômico-industrial da saúde. **Informe** CEIS, Rio de Janeiro, n. 1, 2010.

GADELHA CAG, et al. A dinâmica do sistema produtivo da saúde: inovação e complexo econômico-industrial. Rio de Janeiro: **Ed**. **Fiocruz**. 2012.

GANNAVARAM S et al. Nested PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in slit aspirates from post kala-azar dermal leishmaniasis lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, 42: 1777-1778, 2004.

GLOBAL FORUM FOR HEALTH RESEARCH. Matriz Combinada: um instrumento para a definição de prioridades de pesquisa em saúde. Brasília: **Ministério da Saúde**, 87p, 2004.

GOIHMAN-YAHR M. American mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Clinics**, 12:703-712, 1994.

GOMES R et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 3;105(22):7845-50, 2008.

GONTIJO B, CARVALHO MLR. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36:71-80, 2003

GONTIJO CMF & MELO MN. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7:1–12, 2004.

GOOGLEPATENTS. Google. Disponível em: <https://patents.google.com/>. Acesso em: 31 jul, 2014.

GOSWAMI, R. P.; BAIRAGI, B.; KUNDU, P. K. K39 strip test-easy, reliable and cost-effective field diagnosis for visceral leishmaniasis in India. **Journal-Association Of Physicians Of India**, v. 51, p. 759-761, 2003.

GSK. **Our mission and strategy**. Disponível em: <http://www.gsk.com/>. Acesso em: 16 mai. 2016.

GUERIN PJ et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, 2 (8): 494-501, 2002.

GUIMARÃES MC et al. Comparison on the performance of *Leishmania* major-like and *Leishmania braziliensis braziliensis* as antigen for New World leishmaniasis IgG-immunofluorescence test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 33: 503–508, 1991.

GUIMARÃES R. Bases para uma política nacional de ciência, tecnologia e inovação em saúde. **Ciências e Saúde Coletiva**, 9(2):375-87, 2004.

_____. et al. Pesquisa em saúde no Brasil: contexto e desafios. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. Esp, 2006.

HARITH, AE. et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, p. 583-586, 1986.

_____ et al. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 26, n. 7, p. 1321-1325, 1988.

HO EA, SOONG T, LI Y**.** Comparative merits of sternum, spleen, e liver punctures in the study of visceral leishmaniasis**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 41(5): 629-36, 1948.

HOUGHTON RAYMOND L. Methods and Materials for the Detection of Leishmania Infection. G01N 33/56905. US **20090317841**. 2009. 2005.

HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. **New England Journal of Medicine**., v.357, p.1018-27, 2007.

HOTEZ, Peter J. et al. Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0003895, 2016.

IBGE. Pintec: Pesquisa de Inovação Tecnológica: 2008. **IBGE** - Coordenação de indústria, Rio de Janeiro, 2010.

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial [online]. Belo Horizonte, Brasil; 2013. [capturado 23 de dez. 2014]. Disponível em: < http://www.inpi.gov.br/images/docs/dirpa_estat_portal_out_13_tabela_1_atualizada.pdf >.

_____. INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Patente**.** Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/>. Acesso em: 31 jul. 2014.

_____.Instituto Nacional da Propriedade Industrial [online]. Belo Horizonte, Brasil; 2014a. [capturado 22 de dez. 2014]. Disponível em: < http://www.inpi.gov.br/portal/artigo/guia_informacao_tecnologica >.

_____.Instituto Nacional da Propriedade Industrial [online]. Belo Horizonte, Brasil; 2014b. [capturado 22 de dez. 2014]. Disponível em: < http://www.inpi.gov.br/portal/artigo/guia_basico_patentes >.

_____.Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Tabela de retribuições dos serviços prestados pelo INPI [online]. Brasil; 2015. [acessado ago. 2016]. Disponível em: < http://www.inpi.gov.br/serviços >.

_____.Instituto Nacional Da Propriedade Industrial. Estatísticas preliminares. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/estatisticas/estatisticas-preliminares-2013-a-partir-de-2013>. Acesso em: 25 jun. 2016.

_____.instituto nacional da propriedade industrial. **Busca de patentes**. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/>. Acesso em: 01 ago. 2016b.

JASINSKI, A. Academy-industry relations for innovation in Poland. University of Sussex, **Science Policy Research Unit**, 1997.

JARA M et al. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Leishmania* (*Viannia*) Organisms in Skin and Mucosal Lesions: Exploratory Study of Parasite Load and Clinical Parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, 51(6): 1826-33, 2013.

JELINEK T, EICHENLAUB S, LÖSCHER T. Sensitivity, specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 18: 669-670, 1999.

KHAN MG et al. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. **Parasites & Vectors**, 3:114, 2010.

_____. et al. Short communication: evaluation of a new rapid diagnostic test for quality assurance by kala azar elimination programme in bangladesh. **Journal of Parasitology Research**, 2001:862475, 2011.

_____. et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of Leishmania DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1. 2012.

KASHINO SS et al. Identification of *Leishmania infantum chagasi* proteins in urine of patients with visceral leishmaniasis: a promising antigen discovery approach of vaccine candidates. **Parasite Immunology**, 34(7):360-71, 2012.

KAR K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, 21: 123-52, 1995.

KEALEY A, SMITH R**.** Neglected tropical diseases: infection, modeling, and control. **Journal of health care for the poor and underserved**, 21(1): 53-69, 2010.

KEMPF VA; TREBESIUS K; AUTENRIETH IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, 38: p. 830–838, 2000.

KILLCK KR; RIOUX JA. Intravectorial cycle of Leishmania in the sandflies. **Annales de Parasitologie Humaine et Compareé**, 66(suppl.1): 71-74. 1991.

KURKJIAN, K. M. et al. Application of an improved method for the recombinant K39 enzyme-linked immunosorbent assay to detect visceral leishmaniasis disease and infection in Bangladesh. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 12, p. 1410-1415. 2005.

KUPFER, D.; TIGRE, P. B. Modelo SENAI de prospecção: documento metodológico. Capítulo 2: prospecção tecnológica. In: ORGANIZACION INTERNACIONAL DEL TRABAJO CINTERFOR**. Papeles de La Oficina Técnica. Montevideo**: OIT/CINTERFOR, 2004. n. 14.

KUPFER, David. Dez anos de política industrial. **Revista Valor Econômico.** v. 8. 2013.

LABONTE R, SPIEGEL J. Setting global health research priorities. **British Medical Journal**, 326:722-3, 2003.

LAINSON R & SHAW JJ. Evolution classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. **The Leishmaniases in Biology and Medicine**, 1-120. 1st ed. London: Academic Press, 1987.

_____. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 1(2): 13-32, 2010.

LACHAUD L et al. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, 39:613-6, 2001.

LINDOSO JA & LINDOSO AABP. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 51(5): 247-253. 2009.

LOPEZ-VELEZ R et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfected with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 58(4): 436-443, 1998.

MAALEJ, IA et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified Leishmania antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 312-320. 2003.

MACHADO DE ASSIS TS et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 17, 105-16, 2008.

_____ et al. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 103(12):1269-72, 2009.

_____, RABELLO A, WERNECK GL. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, 17(10):1202-7, 2012.

_____ et al. Study of implementation and direct cost estimates for diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in an urban area in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 31(10):2127-36, 2015.

_____ et al. Acceptance and potential barriers to effective use of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in an urban area in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 49(2):241-4, 2016.

MACHADO-SILVA, Alice et al. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: a patent landscape. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 25, n. 3, p. 247-260, 2015.

MAIA-ELKHOURY AN et al. [Analysis of visceral leishmaniasis reports by the capture-recapture method]. **Revista de Saúde Pública**, 41(6):931-7, 2007.

MAIA Z et al. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematicreview with meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 6(1):e1484, 2012.

MANDAL J et al. Evaluation of direct agglutination test, rk39 Test, and ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 79(1):76-8, 2008.

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

MARTINEZ, MEM; BRAGA JR; ANTUNES, A. Mapeamento das tecnologias do setor têxtil por meio de documentos patentários depositados no brasil. **Americana**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2014.

MARY, C et al. Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249-5255, 2004.

MATLASHEWSKI G et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis in Bihar India: comparison of the rK39 rapid diagnostic test on whole blood versus serum. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7(5):e2233, 2013.

MATHUR P, SAMANTARAY J, CHAUHAN NK. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of kala-azar & post kala-azar dermal leishmaniasis at a tertiary care centre of north India. **Indian Journal of Medical Research**, 122(6):485-90, 2005.

MAURYA R et al. Evaluation of blood agar microtiter plates for culturing *leishmania* parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, 48: 1932-1934, 2010.

MAYERHOFF, ZDVL. Uma análise sobre os estudos de prospecção tecnológica. **Cadernos De Prospecção**, v. 1, n. 1, p. 7-9, 2009.

MELO MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia veterinária**, 23 (1): 41-45, 2004.

MENDONÇA SCF et al. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 83: 347-355, 1988.

MEREDITH, SE. et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1742-1745, 1995.

MICHALICK MSM, Genaro O. Leishmaniose visceral americana. In: Neves DP (ed.). Parasitologia humana. 11. **ed. São Paulo**: Atheneu, p. 67-83, 2005.

MIKITA, K et al. The Direct Boil-LAMP method: a simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. **Parasitology international**, v. 63, n. 6, p. 785-789. 2014.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. MCTI. **Relatório Anual de Atividades de P&D**. 2013.

_____.CDT/Unb. Estudo de projetos de alta complexidade indicadores de parques tecnológicos. 2014. Disponível em: < http://www.cdt.unb.br>. Acesso em jun. 2016.

_____. Estratégia Nacional De Ciência, Tecnologia E Inovação 2016-2019. 2016

MINISTÉRIO DA SAÚDE. MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde legis. sistema de legislação da saúde. 2012. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: 24 jun. 2016.

_____. DATASUS. Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade, 2015. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br>. Acesso em nov. 2015.

_____. DATASUS. Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade, 2016. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br>. Acesso em março 2016.

_____. Ministério da Saúde. Nota informativa N°29 de 2014, CGDT/DEVIT/SVS/MS. Esclarecimento sobre substituição do teste rápido KALAZAR DETECT®, pelo teste rápido IT LEISH® para diagnóstico de pacientes com leishmaniose visceral. **Brasília**, 17 de dezembro de 2014.

MOLINET FJ et al. Specificity of the rapid rK39 antigen-based immunochromatographic test Kalazar Detect(r) in patients with cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 108(3), 2013.

MOHAN S et al. Nano-structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (kala-azar). **Analyst**, 136:2845–2851, 2011.

MOHAPATRA, TM et al. Compararative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 02, p. 114-117, 2009.

MONDAL, D et al. Visceral leishmaniasis elimination programme in India, Bangladesh, and Nepal: reshaping the case finding/case management strategy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, p. e355, 2009.

MONTALBAN C et al. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Cooperative Group for the Study of Leishmaniasis in AIDS. **Journal of Infection**, 21(3):261-70, 1990.

MONTENEGRO J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Archives of Dermatology and Syphilis**, 13:187-184, 1926.

MONZOTE, LIANET. Antileishmanial patents antileishmanial current drugs and relevant patents. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 6, n. 1, p. 1-26, 2011.

MOREL, RLM. Ciência e Estado: a política científica no Brasil. **São Paulo: TA Queiroz**, 1979.

_____. Inovação em saúde e doenças negligenciadas**. Cadernos de Saúde Pública**, 22(8): 1522-1523, 2006.

MOURA AS et al. Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 46(5):589-93, 2013.

MOURA, AMM; CAREGNATO, SE. Co-autoria em artigos e patentes: um estudo da interação entre a produção científica e tecnológica. **Perspectivas em ciência da informação.** Vol. 16, n. 2 (abr./jun. 2011), p. 153-167. 2011.

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, Sep;109(9):594-600, 2015.

NCBI. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Pubmed. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 30 jan. 2015.

NATURE. INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE. **Nature Index Tables**. Disponível em:<http://www.nature.com/nature/journal/v522/n7556_supp/fig_tab/522s34a_t1.html>. Acesso em: 25 jun. 2016.

NDAO M et al. Is SELDI-TOF a valid tool for diagnostic biomarkers? **Trends in Parasitology**, 26(12):561-7, 2010.

NICOLAS, LUC et al. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1666-1669, 2002.

OLIVEIRA E et al. Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 103 (12): 1279-1281. 2009.

_____, SALIBA SW, ANDRADE CF, RABELLO A. Direct agglutination test (DAT): improvement of biosafety for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 105 (7): 414-416. 2011.

_____, SALIBA SW, SALIBA JW, RABELLO A. Validation of a direct agglutination test prototype kit for the diagnosis of visceral leishmaniasis**. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 107 (4) 243-7, 2013.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses. Informe epidemiológico das Américas. [online]. Belo Horizonte, Brasil, 2015. Disponível em: < http://new.paho.org/leishmaniasis >. Acesso: 16 de dezembro de 2015.

OCTAVIANO, Carolina. A institucionalização da pesquisa e o sistema nacional de CT&I no Brasil. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**. 2011.

PACHECO, CA. As reformas da política nacional de ciência, tecnologia e inovação no Brasil (1999-2002). documento preparado para la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (**CEPAL**), Campinas, Brasil, 2007.

PACHECO, C.A. & CORDER, S. Mapeamento institucional e de medidas de política com impacto sobre a inovação produtiva e a diversificação das exportações. CEPAL – Colección Documentos de Proyectos, 2010.

PANG T. Setting global health research priorities: ethics should also guide global health research. **British Medical Journal**, 326:1399, 2003.

PATTABHI S et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 14;4(9). pii: e822, 2010.

PEDRAS MJ et al. A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 47(3):477-85, 2003.

_____ et al. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**,102 (2): 172-178, 2008.

PERUHYPE-MAGALHÃES V, MACHADO-DE-ASSIS TS, RABELLO A. Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 107(7):951-2, 2012.

PETRAMALE, CA. Avaliação e incorporação: do quê precisamos realmente?. OPAS/OMS – representação Brasil. **Brasília**, v. 1, n. 8. 2016.

PINTADO et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. **Medicine (Baltimore)**, 80(1):54-73, 2001(a).

PINTADO V et al. HIV-associated visceral leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, 7(6):291-300, 2001(b).

PIRES, EA et al. Produção Científica E Tecnológica: Relação Entre Artigos E Patentes De Universidades Do Nordeste Do Brasil.ALTEC, Inovação para além da tecnologia. **XVI Congresso Latino-Iberoamericano de Gestão da Tecnologia**. 2015.

PIRMEZ, Claude et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1819-1823, 1999.

PIZZUTO M et al. Role of PCR indiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfected with human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Clinical Microbiology**, 39: 357-361, 2001.

POPPERT, Sven et al. Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4081-4089, 2002.

_____ et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3390-3397, 2005.

_____ et al. Accelerated identification of Staphylococcus aureus from blood cultures by a modified fluorescence in situ hybridization procedure. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 65-68, 2010.

QU JQ et al. Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a Leishmania kinesin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 88(5):543-5, 1994.

RAJASEKARIAH GH et al. A novel exo-antigen-based ELISA for the detection of canine leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**,78(4):616-23, 2008.

RAMÍREZ JR et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (10): 3768-3773, 2000.

RAUEN CV. O Novo marco legal da inovação no Brasil: o que muda na relação ICT-empresa?. **Radar**. 2016.

REITHINGER R et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**.7, 581–596. 2007.

REY, L. Parasitologia, 2ª edição. **Editora Guanabara Koogan,** 2001.

RITMEIJER K et al. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Jan;74(1):76-80, 2006.

ROCHA RD et al. [Anti-live *Leishmania(Viannia) braziliensis* promastigote antibodies, detected by flow cytometry, to identify active infection in american cutaneous leishmaniasis]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(6):551-62, 2003.

RODGERS, MR et al. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania.**Experimental parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

ROFFI J et al. Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 29: 183–189, 1980.

ROMERO GAS et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Trop**, 93: 49–56, 2005.

RUIVO, Beatriz. 'Phases' or 'paradigms' of science policy?. **Science and Public Policy**, v. 21, n. 3, p. 157-164, 1994.

RYAN, JR. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 1037-1043.2002.

SAAD AA et al. Diagnostic accuracy of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of leishmaniasis in Sudan. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 4:e776, 2010.

SABINO, LS. Caracterização da proteção de patentes como estímulo ao desenvolvimento econômico. **Caracterização da proteção às patentes como estímulo ao desenvolvimento econômico**, 2007.

SAFAEI A, MOTAZEDIAN MH, VASEI M. Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. **Dermatology**, 205(1):18-24, 2002.

SAFAVIEH, M et al. Microfluidic electrochemical assay for rapid detection and quantification of Escherichia coli. **Biosensors and Bioelectronics**, 31:523–528, 2012.

SAGHROUNI F et al. Immunochromatographic rK39 strip test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Tunisia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**,103(12):1273-8, 2008.

SALERNO, M.; DAHER, T. Política industrial, tecnológica e de comércio exterior do governo federal (PITCE): balanço e perspectivas. **Brasília: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial**, 2006.

SALERNO, MS; KUBOTA, LC. Estado e inovação. Políticas de incentivo à inovação tecnológica**. Brasília: Ipea**, p. 13-64, 2008.

SALAM, MA et al. Peripheral blood buffy coat smear: a promising tool for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 837-840. 2012.

Salles-Filho, S; Bonacelli, M.B.M. "Trajetórias e agendas para os institutos e centros de pesquisa no Brasil". **Revista Parcerias Estratégicas**, documento para a 3ª Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, 2005. Disponível <http://www.cgee.org.br/arquivos/p_20_5.pdf>. Acesso em jul. 2016.

SARAVIA, Nancy Gore et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 4, p. 725-735, 1989.

SARKER CB et al. Clinical profile of kala-azar in adults: As seen in Mymensingh Medical College Hospital, Mymensingh, Bangladesh. **Mymensingh Medical Journal**, 12(1):41-4, 2003.

SCHALLIG HDFH, OSKAM L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine & International Health**, 7(8): 641-51, 2002.

SCHALLIG HD, CANTO-CAVALHEIRO M, DA SILVA ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97(7):1015-8, 2002.

SCHMITT, BRYAN H.; ROSENBLATT, JON E.; PRITT, BOBBI S. Laboratory diagnosis of tropical infections. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 513-554, 2012.

SCHULZ, A et al. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic Leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1529-1535, 2003.

SCHUMPETER, J. Capitalism, Socialism and Democracy. **Londres**: Allen & Unwin, 1942.

SCHUR LF, JACOBSON RL. Leishmaniasis in biology and medicine. **Parasitological techniques**, p. 500–541. In W. Peters and R. Killick-Kendrick (ed.), vol. 1. Academic Press, 2001.

SECTIE. Secretaria De Ciência, Tecnologia E Insumos Estratégicos Departamento De Ciência E Tecnologia. **Política nacional de ciência, tecnologia e inovação em saúde**. 2008.

SES. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Nota técnica Nº 015/2016-DVA/SVEAST/SUB.VPS/SES-MG. 2016.

SHAW JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 69:323-335, 1975.

SIDDIG M et al. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 82(1):66-8, 1988.

SILVA OD. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 7(2): 213-48, 1915.

SINGH DP, et al. In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of kala-azar. **Journal of Health, Population and Nutrition**, Jun;28(3):281-5. 2010.

SINGH, S. et al. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. **Journal of Parasitology**, 81:1000–1003.1995.

SIVAKUMAR, R et al. Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. **Protein expression and purification**, v. 46, n. 1, p. 156-165. 2006.

_____ et al. Expression and characterization of a recombinant kinesin antigen from an old Indian strain (DD8) of *Leishmania donovani* and comparing it with a commercially available antigen from a newly isolated (KE16) strain of L. donovani. **Infection, genetics and evolution**, v. 8, n. 3, p. 313-322, 2008.

SKEIKY YA et al. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. **Infection and Immunity**, 63(10):4105-14, 1995.

SOUSA-GOMES ML et al. Coinfecção Leishmania-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 20(4):519-26, 2011.

SRIVASTAVA, Pankaj et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1-6, 2011.

SUNDAR S et al. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **Lancet**, 351: 563-565, 1998.

_____ et al. Immunochromatogaphic strip test detection of anti k39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 96: 19-23, 2002(a).

_____ et al. Noninvasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala-azar referral unit. **Clinical Infectious Diseases**, 1;35(5):581-6, 2002(b).

_____ & Rai M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** 9: 951-8. 2002.

_____ et al. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Jun;100(6):533-7, 2006.

_____ et al. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. **Tropical Medicine & International Health**, 12(2):284-9, 2007.

SUTZ, JUDITH. The university–industry–government relations in Latin America. **Research policy**, v. 29, n. 2, p. 279-290, 2000.

SUZIGAN, W. ALBUQUERQUE, E. M. A interação entre universidades e empresas em perspectiva histórica no Brasil, Texto para discussão 329, Belo Horizonte: **UFMG/Cedeplar**. 2008.

TABATABAIE F et al. Th1 Platform Immune Responses Against *Leishmania major* Induced by Thiol-Specific Antioxidant-Based DNA Vaccines. **Jundishapur Journal Microbiology**,7(2):e8974, 2014.

TAKAGI H et al. Short report: production of recombinant kinesin-related protein of Leishmania donovani and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 76(5):902-5, 2007.

_____ et al. Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 4, p. 578-582. 2009.

TEIXEIRA-CARVALHO A et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometrymethod for differential serological diagnosis of chagas disease andleishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 15;10(4):e0122938, 2015.

TERÁN-ÁNGEL G et al. [Non invasive diagnostic tools for visceral leishmaniasis: a comparison of the immunoserological tests DAT, rK26 and rK39]. **Biomedica**, 30(1):39-45, 2010.

TOLEDO AC Jr et al. Assessment of the quality of life of patients with cutaneous leishmaniasis in Belo Horizonte, Brazil, 2009-2010. A pilot study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**,107(5):335-6, 2013.

THOMSON REUTERS. Thomson Reuters Innovation. Disponível em < https://www.thomsoninnovation.com>. 2014.

TOZ, SO et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of Leishmania parasite from human and dog clinical samples in Turkey. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. e2205. 2013.

TSUKAYAMA, PABLO et al. A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. e1956, 2013.

USPTO. UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE . Patent full. Disponível em: <http://patft.uspto.gov/>. Acesso em: 01 mai. 2016.

VAISH M et al. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. **Clinical Microbiology and Infection**, 18(1):81-5, 2012.

VAN DER MEIDE, WF. et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of Leishmania parasites in skin biopsy samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5560-5566. 2005.

_____ W et al. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. **Journal of Clinical Microbiology**, 46:73–78, 2008.

VASOO S, PRITT BS. Molecular diagnostics and parasitic disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, 33(3):461-503, 2013.

VEEKEN H et al. Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. **Tropical Medicine & International Health**, 8(2):164-7, 2003.

VEGA-LÓPEZ F Review: Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 16: 97-101, 2003.

VERMA, S et al. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 75, n. 4, p. 390-395.2013.

VIDOTTI, CCF; CASTRO, LLC. Fármacos novos e necessidades do Sistema único de Saúde no Brasil.**Espaço saúde (Online)**, v. 10, n. 2, p. 7-11, 2009.

VILHA, A. M.; FUCK, M. P.; BONACELLI, M. B. Aspectos das trajetórias das políticas públicas de ciência, tecnologia e inovação no Brasil. In: Marchetti, Vitor. (Org.). **Políticas Públicas em Debate**. 1ed.São Bernardo do Campo: MP Editora. p. 251-270. 2013.

VILHA, A. M.; MASKIO, S. Trajetória das Políticas de CT&I no Brasil e o Impacto do Atual Ajuste Fiscal. In: XXI Encontro Nacional de Economia Política, 2016, São Bernardo do Campo. **Anais do XXI Encontro Nacional de Economia Política**, 2016.

VIOTTI EB. Brasil: de política de C&T para política de inovação? Evolução e desafios das políticas brasileiras de ciência, tecnologia e inovação19. **Avaliação de políticas**, p. 137, 2008.

WEIRATHER, JL. et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of Leishmania spp. in human samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3892-3904, 2011.

WELLINGHAUSEN, Nele et al. Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical Pseudomonas aeruginosa, from patients with cystic fibrosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4070-4075. 2005.

WERNECK et al. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciências e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 39-62, 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. **World Health Organization**.**Report 949**. 2010.

_____. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf>.

_____. World Health Organization Global Health Observatory (GHO) - **Neglected tropical diseases [online].** Disponível em: < http://www.who.int/gho/neglected_diseases/en/ >. Acessado 12 de jan. de 2015a.

_____. /SEARO. Regional Strategic Framework for Elimination of Kala-Azar from the South-East Asia Region (2005–2015). Geneva: WHO/SEARO. 2005.

WHO/TDR. Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance. **Diagnostics Evaluation Series**, nº 4. 2011.

WIPO. WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION. International patent classification. Disponível em: <http://www.wipo.int/portal/en/index.html>. Acesso em: 31 jul. 2014.

_____.WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION. ePCT public. Disponível em: <http://www.wipo.int/portal/en/index.html>. Acesso em: maio. 2016.

WORTMANN, G et al. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 583-587, 2001.

WUNSCH-VINCENT, Sacha; LANVIN, Bruno; DUTTA, Soumitra. The Global Innovation Index 2015: Effective Innovation Policies for Development. **eSocialSciences,** 2015.

XU X et al. Structure and function of a "yellow" protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. **Journal of Biological Chemistry**. 2011.

YOUNG DG & DUNCAN MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**,54: 88, 1994.

ZEPEDA BERMUDEZ, JA et al. O acordo trips da OMC e a proteção patentária no Brasil: mudanças recentes e implicações para a produção local e o acesso da população aos medicamentos. **ENSP**, 2000.

ZIJLSTRA EE et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 86(5):505-7, 1992.

_____. et al. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Leishmania donovani infection. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 5, n. 5, p. 717-720, 1998.

_____. et al. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Tropical Medicine & International Health**, 6(2):108-13, 2001.