



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

CIBELE CARINE SILVA

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LBRM0750  
DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* EM ENSAIO DE  
ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

RECIFE  
2023

CIBELE CARINE SILVA

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LBRM0750  
DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* EM ENSAIO DE  
ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biomedicina da Universidade Federal de  
Pernambuco, como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

Orientadora: Dra. Valéria Pereira  
Hernandes.

Co-orientadora: Me. Allana Maria de  
Souza Pereira

RECIFE  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Cibele Carine.

Avaliação da proteína recombinante Lbrm0750 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ensaio de ELISA para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana / Cibele Carine Silva. - Recife, 2023.

72 p. : il., tab.

Orientador(a): Valéria Pereira Hernandes

Cooorientador(a): Allana Maria de Souza Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Proteína recombinante. 2. Imunologia. 3. Diagnóstico. 4. ELISA. 5. Anticorpo. I. Hernandes, Valéria Pereira . (Orientação). II. Souza Pereira, Allana Maria de . (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

CIBELE CARINE SILVA

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LBRM0750  
DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* EM ENSAIO DE  
ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Biomedicina da Universidade  
Federal de Pernambuco, como  
pré-requisito à obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dra. Valéria Pereira Hernandes.  
Instituto Aggeu Magalhães / Departamento de Imunologia

---

Prof Dr. Walter Lins Barbosa Junior.  
Instituto Aggeu Magalhães / Departamento de Parasitologia

---

Mestre Marton Kaique De Andrade Cavalcante.  
Instituto Aggeu Magalhães / Departamento de Imunologia

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que me deu forças, me acompanhou e selecionou as pessoas e momento certo para que tudo acontecesse. Se cheguei até aqui foi aqui porque Ele preparou todo o caminho.

À minha avó (*in memoriam* Edite), obrigada por todos os ensinamentos e por nunca medir esforços para me oferecer o melhor. Palavras não são suficientes para agradecer tudo que a senhora fez por mim. Sei que está muito orgulhosa por mais essa conquista que é nossa. Saudades!

À minha tia, Rosângela, obrigada por todo suporte e por nunca medir esforços para me ajudar

Aos meus amigos de infância e aqueles que foram um presente da universidade. Espero levar vocês comigo para sempre

À minha orientadora, Valéria. Obrigada pelos cuidados que vão além do ambiente de trabalho, todos os ensinamentos, e por me ajudar sempre da melhor maneira

Agradeço à minha co-orientadora, Allana, que esteve comigo ao longo desses anos. Muito obrigada por sempre me ajudar da melhor forma possível, independente do dia ou horário. Obrigada por todo apoio, conversas e risadas. Te desejo tudo de maravilhoso e muito sucesso em sua jornada

Ao meu namorado, Gustavo. Obrigada por todo apoio e compreensão.

À todos os meus companheiros de laboratório do IAM: Aílton, Aline, Ana Barbara, Cleiton, Dany, Fabio, Marton, Micaela, Policarpo. É ótimo trabalhar com todos vocês

Aos membros da banca avaliadora por aceitarem o convite, pelas discussões, sugestões e contribuições que serviram para enriquecer este trabalho

À todos os professores que contribuíram ao longo dos anos

Ao Instituto Aggeu Magalhães por toda infraestrutura cedida para realização do trabalho

À todos que não foram citados, mas contribuíram para realização desse trabalho. Muito obrigada!

SILVA, Cibele Carine. **Avaliação da proteína recombinante Lbrm0750 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ensaio de ELISA para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2023. 72. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Nas Américas, o Brasil apresenta a maior prevalência de casos, onde Pernambuco encontra-se como um dos estados endêmicos para a doença. A LT apresenta um amplo espectro clínico, histopatológico e imunológico. O diagnóstico é realizado mediante a associação de dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, visto que não existe um teste considerado padrão ouro. Um dos testes mais utilizados na rotina clínica é o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Entretanto, essa técnica pode apresentar limitações, principalmente relacionadas ao tipo de antígeno utilizado, dificultando a precisão do diagnóstico. Nesse cenário, uma possível solução é a aplicação de ferramentas de bioinformática. Essa abordagem é utilizada na busca por antígenos específicos de agentes infecciosos, com intuito de aperfeiçoar o desempenho dos métodos existentes. Assim, o objetivo do trabalho foi utilizar a proteína recombinante Lbrm0750 de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, no ensaio de ELISA, visando aperfeiçoar o desempenho do teste, sobretudo a sensibilidade e especificidade, além de comparar o ensaio de ELISA, utilizando o extrato bruto de proteínas da *L. (V.) braziliensis*. Inicialmente, as condições para obtenção da proteína 0750 relacionadas ao sistema de expressão, temperatura ideal de cultivo, como também características de solubilidade, foram avaliadas. Em seguida, foi verificado que com a linhagem BL21 (DE3) pLysS a 30°C ocorreu uma melhor expressão da proteína 0750. Após os ajustes descritos, a proteína foi direcionada aos ensaios de ELISA. Para tal, amostras de pacientes portadores de LT ativa (N=50) com positividade confirmada por testes parasitológicos e/ou moleculares, bem como amostras de indivíduos saudáveis (N=28). Para os ensaios de ELISA, a proteína 0750 foi utilizada na concentração de 100ng e as amostras foram diluídas na condição de 1:200, já utilizando o extrato bruto como antígeno, foi utilizada a concentração de 500ng, e as amostras foram diluídas na condição de 1:450. Após essas etapas, foi avaliado que a proteína 0750 reagiu com 80% (40/50) das amostras de pacientes. Já com o extrato bruto, o resultado foi de 36% (18/50). A melhor sensibilidade (80%) obtida com a proteína 0750 pode estar relacionada à sua obtenção, visto que é derivada de regiões com maior número de epítomos específicos de célula B no proteoma de *L. (V.) braziliensis*. Por outro lado, avaliando o desempenho das moléculas com amostras de indivíduos saudáveis, a especificidade obtida com o antígeno bruto foi de 100%, enquanto a proteína 0750 apresentou 35,7%. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que embora sejam necessários ajustes na metodologia com a proteína 0750, sua utilização como antígeno parece promissora para identificação de pacientes portadores de LT em comparação a abordagem convencional do ensaio de ELISA indireto, utilizando o extrato bruto do parasito.

**Palavras-chave:** Proteína Recombinante. Imunologia. Diagnóstico. ELISA. Anticorpos.

SILVA, Cibele Carine. **Avaliação da proteína recombinante Lbrm0750 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ensaio de ELISA para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2023. 72. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## ABSTRACT

Tegumentary Leishmaniasis (TL) is a disease caused by different species of protozoa of the *Leishmania* genus. In the Americas, Brazil has the highest prevalence of cases, where Pernambuco is one of the endemic states for the disease. TL presents itself with a broad clinical, histopathological and immunological spectrum. The current diagnosis is made through the association of epidemiological, clinical, and laboratory information, since no test is considered the gold standard. One of the most used tests in the clinical routine is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), however, this approach may present restrictions, mainly related to the type of antigen used, hindering the accuracy of the diagnosis. In this scenario, a possible solution is the application of bioinformatics tools. This approach is used as a valuable strategy in the search for specific antigens of infectious agents, aiming to optimize the performance of existing methods. Thus, the objective of this work was to improve ELISA assay test performance using the recombinant protein Lbrm0750 from *Leishmania (Viannia) braziliensis* and in addition to comparing the assay using *L. (V.) braziliensis* crude protein extract. Initially, conditions for obtaining the recombinant protein related to the expression system, ideal culture temperature, as well as solubility characteristics, were evaluated. Then, it was verified that better expression of the 0750 protein with the BL21 (DE3) pLysS strain occurred at 30° C. After adjusting the best conditions, the protein was directed to the ELISA assays. For this purpose, serum samples from patients with active TL (N=50) with positivity confirmed by parasitological and/or molecular tests, as well as samples from healthy individuals (N=28), were used. For the ELISA assays, the 0750 protein was used at a concentration of 100ng and the samples were diluted in the condition of 1:200, already using the crude extract as antigen, the concentration of 500ng was used, and the samples were diluted in the condition of 1 :450. After these steps, It was estimated that the 0750 protein reacted with 80% (40/50) of the samples from LT carriers. With the crude extract, the result was 36% (28/50). The higher sensitivity (80%) obtained with the 0750 protein may be related to its obtaining, since it is derived from regions with a greater number of B-cell specific epitopes in the proteome of *L. (V.) braziliensis*. On the other hand, when evaluating the performance of the molecules with samples from healthy individuals for LT, the specificity obtained with the crude antigen was 100%, while the performance of the 0750 protein was 35.7%. Thus, the results obtained suggest that although adjustments are needed in the methodology with the 0750 protein, its use as an antigen seems to be a more relevant approach for identifying patients with TL compared to the conventional approach of the ELISA assay using the crude extract of the parasite.

**Key words:** Recombinant protein. Immunology. Diagnosis. ELISA. Antibodies.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Mapa de distribuição mundial da Leishmaniose Tegumentar, 2020.	14
<b>Figura 2</b> – Prevalência da Leishmaniose Tegumentar no Brasil no ano de 2019- 2021.	15
<b>Figura 3</b> – Formas evolutivas do parasito <i>Leishmania</i> spp.	17
<b>Figura 4</b> – Fêmea de flebotomíneo	18
<b>Figura 5</b> – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	19
<b>Figura 6</b> – Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	23
<b>Figura 7</b> – Avaliação da expressão da proteína recombinante 0750 utilizando diferentes linhagens de <i>E. coli</i>	41
<b>Figura 8</b> - Teste de diferentes temperaturas de indução da proteína 0750	42
<b>Figura 9</b> – Indução da proteína recombinante 0750.	43
<b>Figura 10</b> – Teste de solubilidade da proteína 0750	44
<b>Figura 11</b> – Purificação da proteína recombinante 0750.	45
<b>Figura 12</b> – Padronização da concentração em nanograma da proteína recombinante 0750	46
<b>Figura 13</b> – Padronização da diluição do plasma para a proteína recombinante 0750	47
<b>Figura 14</b> – Reatividade das amostras de portadores de LT no teste de ELISA utilizando a proteína 0750	48
<b>Figura 15</b> – Padronização da concentração do extrato bruto total de proteínas da <i>L. (V.) braziliensis</i> .	49
<b>Figura 16</b> – Padronização da diluição do plasma para o extrato bruto total de proteínas da <i>L. (V.) braziliensis</i>	50
<b>Figura 17</b> –Resultado do teste de ELISA com o extrato bruto para identificação de pacientes portadores de LT	51
<b>Figura 18</b> – Comparação entre as curvas ROC da proteína 0750 e o antígeno bruto de <i>L. (Viannia) braziliensis</i>	52

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Análise de desempenho dos testes de ELISA com a proteína 0750 e o extrato bruto de *L. (V.) braziliensis* 53

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR (LT)	14
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO	16
2.3	VETOR	17
2.4	CICLO DE VIDA DO PARASITO	18
2.5	RESPOSTA IMUNE	19
2.6	FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA	23
2.6	TRATAMENTO	25
2.7	DIAGNÓSTICO	27
2.7.1	Diagnóstico parasitológico	28
2.7.2	Diagnóstico molecular	29
2.7.3	Diagnóstico sorológico	30
2.8	FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA APLICADAS AO IMUNODIAGNÓSTICO DA LT	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	35
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>35</b>
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO	35
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	36
4.3	EXAMES LABORATORIAIS DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES	36
4.4	OBTENÇÃO DO PLASMA	36
4.5	OBTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	37
4.6	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	37
4.7	ORIGEM DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	37
4.8	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750	38
4.9	ENSAIO DE ELISA UTILIZANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750 DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	38
38		40

4.10	ENSAIO DE ELISA UTILIZANDO O EXTRATO BRUTO DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	40
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
5.1	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750 UTILIZANDO DUAS LINHAGENS DE <i>E. COLI</i>	42
5.2	OTIMIZAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750	43
5.3	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750	43
5.4	TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750	44
5.5	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750	46
5.6	OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DE LT UTILIZANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750	46
5.7	AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750 NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT ATRAVÉS DO TESTE DE ELISA.	48
5.8	OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DE LT UTILIZANDO O EXTRATO BRUTO DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	49
5.9	AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT ATRAVÉS DO TESTE DE ELISA.	51
5.10	COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750 E O EXTRATO BRUTO DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR POR ELISA	52
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>72</b>
	ANEXO A – Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da IAM	72



## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, negligenciada e considerada um grave problema de saúde pública mundial devido a sua ampla distribuição. A doença encontra-se presente em mais de 100 países, acometendo cerca de 1 milhão de pessoas anualmente (OMS, 2021). Dentre os países endêmicos das Américas, o Brasil apresenta a maior prevalência de notificações, com casos confirmados em todos os estados, com maior destaque para o Nordeste, considerada região endêmica (ANDRADE *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2017). No estado de Pernambuco, já foram registrados casos em todo território, com maior predominância na Zona da Mata (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

Sabe-se que cerca de 20 espécies de protozoários parasitos do gênero *Leishmania* já foram descritos como capazes de infectar o homem e causar doença (OMS, 2019). Dentre essas espécies, a *Leishmania (Viannia) braziliensis* é considerada o agente específico da LT no Brasil, devido o grande número de casos associados (BRASIL, 2017). Os parasitos da *L. (V.) braziliensis* podem desencadear manifestações clínicas diversas, que abrangem formas assintomáticas, aparecimento de lesões cutânea (ulceradas, disseminadas e difusas) e a forma mais grave da doença, a mucocutânea, que pode acometer as mucosas da cavidade nasal, faringe e laringe (ARONSON, *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2012).

Devido ao amplo espectro de manifestações clínicas, a resposta imune torna-se complexa, dificultando o estabelecimento de um padrão imunológico. Contudo, é descrito na literatura que a resposta imunológica inicia-se a partir da inoculação do parasito na corrente sanguínea do hospedeiro, através da picada dos insetos vetores, flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo, resultando em um recrutamento de células da imunidade inata e, posteriormente, células da imunidade adaptativa (DE LUCA; MACEDO, 2016). Embora a resposta imunológica apresentada seja variável e pouco compreendida, já foi avaliado que a resposta imune protetora é dependente de Linfócitos T, havendo uma diferença entre resistência e susceptibilidade, dependendo do perfil de resposta das células T CD4+ que é estimulada, podendo ser do tipo 1 ou tipo 2, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2022; DE LUCA; MACEDO, 2016; SOUZA *et al.*, 2013).

Considera-se para o controle da LT o diagnóstico precoce como uma das principais medidas, visto que além de prevenir a evolução da doença, possibilita um melhor direcionamento terapêutico para o indivíduo acometido (ARONSON *et al.*,

2019). O diagnóstico final da LT é obtido por meio de uma associação de fatores clínicos, epidemiológicos e testes laboratoriais (REITHINGER *et al.*, 2007; TAVARES *et al.*, 2017). Para o diagnóstico laboratorial, diversas técnicas já foram descritas, com diferentes abordagens, tais como: moleculares, parasitológicas e sorológicas, porém, essas técnicas variam na precisão dos resultados (DE BRITO *et al.*, 2020).

Quanto aos métodos sorológicos, a metodologia convencional do Ensaio Imunoenzimático (ELISA), utilizando o extrato bruto de proteínas do parasito como antígeno, é uma das formas mais utilizadas na rotina laboratorial (TAVARES *et al.*, 2017). Entretanto, essa técnica pode apresentar limitações como, por exemplo, variações nos valores de especificidade e sensibilidade, que se apresentam diretamente relacionados ao tipo de antígeno escolhido e a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; DE BRITO *et al.*, 2020).

Uma possível solução para tentar contornar essas limitações é baseada no emprego da bioinformática por meio de ferramentas *in silico* que buscam selecionar novos antígenos recombinantes que podem ser integrados às técnicas diagnósticas, com o intuito de elevar a sensibilidade e especificidade dos testes (THOMAZ-SOCCOL, 2018). Sendo assim, objetivando reverter as limitações, novas abordagens vêm sendo exploradas com a aplicação de antígenos recombinantes (DE SOUZA *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2021; MENEZES-SOUZA, *et al.*, 2014).

Visando aprimorar o diagnóstico da Leishmaniose, nosso grupo vem empregando o uso de ferramentas *in silico* (PEREIRA, 2021; TAVARES, 2017). Estas são exploradas para selecionar antígenos recombinantes da *Leishmania*. Um dos principais resultados dessa linha de pesquisa foi a identificação da proteína recombinante Lbrm0750 (nome relacionado à origem de seus genes), a partir da análise *in silico* do proteoma predito de *L. (V.) braziliensis*, buscando identificar possíveis epítomos imunogênicos e específicos para células B. No presente trabalho, a proteína recombinante Lbrm0750 foi avaliada na metodologia do ELISA.

Assim, pretende-se contribuir para o desenvolvimento de um método alternativo e eficaz, utilizando dentro do ensaio de ELISA, um promissor antígeno recombinante de *L. (V.) braziliensis*, que apresente maiores valores de sensibilidade e especificidade.

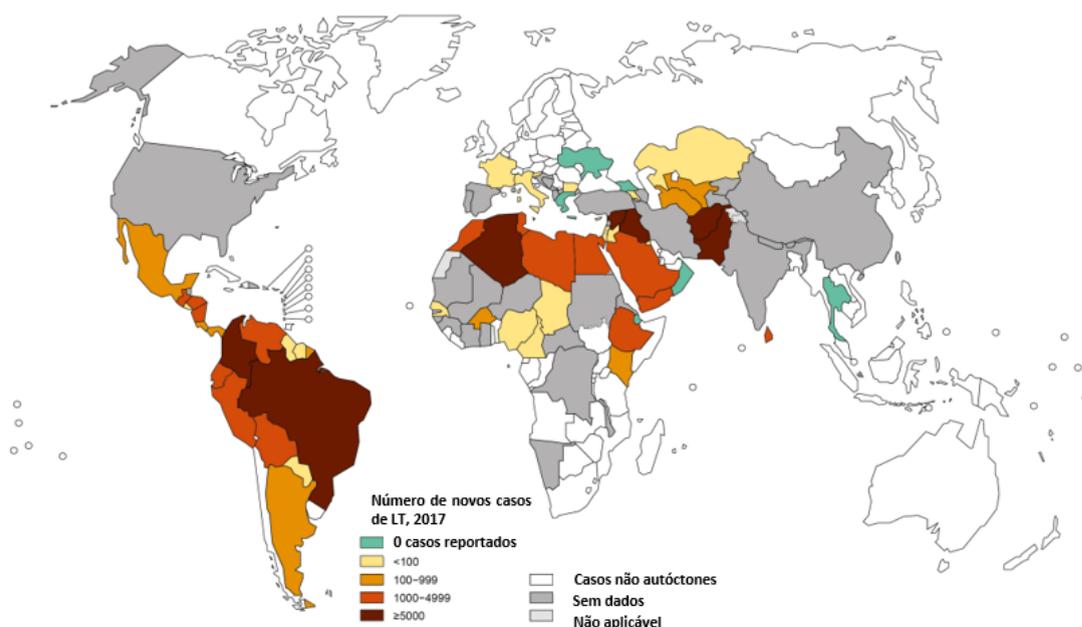
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar (LT)

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, negligenciada e considerada uma das seis doenças infecciosas e parasitárias mais importantes devido à sua magnitude e alta morbidade (OMS). As manifestações clínicas da doença apresentam-se sob diferentes espectros que variam desde casos assintomáticos, lesões cutâneas até a forma mucocutânea, considerada a manifestação mais grave da doença (BRASIL, 2017).

A Leishmaniose Tegumentar, em todas suas formas clínicas, encontra-se presente em regiões tropicais e subtropicais, com a maior concentração presente, principalmente, em áreas mais pobres, sendo assim classificada como uma doença negligenciada. A LT já foi notificada em mais de 100 países, entretanto 90% das ocorrências estão centradas no Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Argélia, Irã, Peru e Brasil (KAPIL *et al.*, 2019). Cerca de 600.000 a 1 milhão de casos são registrados no mundo anualmente, configurando assim um grave problema de saúde pública (OMS), sendo possível visualizar na figura 1 a distribuição mundial da doença

**Figura 1:** Mapa de distribuição mundial da Leishmaniose Tegumentar, 2020.

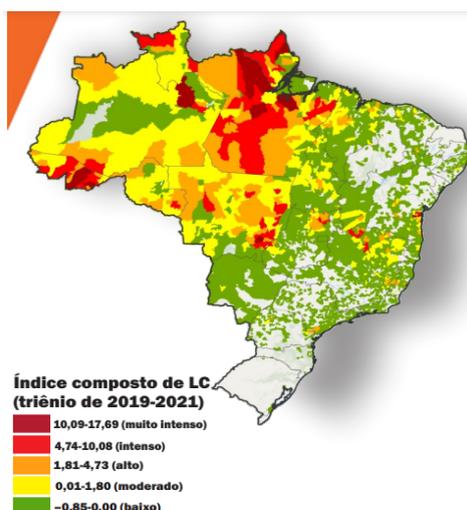


**Fonte:** Adaptado WHO, 2020.

O continente americano é endêmico para a LT, onde também é conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Os casos registrados nas Américas ocorrem desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e do Uruguai (OMS, 2017). No Brasil, notificações de casos já foram relatados em todos os estados, sendo as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste consideradas endêmicas (BRANDÃO-FILHO et al., 1994; NEGRÃO; FERREIRA, 2014). Segundo o informe epidemiológico da Organização Pan-Americana da Saúde (SisLeish - OPAS / OMS), em 2020, o maior número de casos de LT registrado nas Américas foi notificado no Brasil, com cerca de 16 mil notificações em que, dessas, 95% foram correspondentes à forma clínica cutânea e aproximadamente 4% à forma mucosa (Figura 2).

A LT é uma das doenças dermatológicas que mais necessita de atenção, devido seu acometimento envolvendo manifestações cutâneas que podem ser localizadas, disseminadas, ou com o risco de evoluir para a forma mucocutânea, com possibilidade de desenvolver deformidades faciais, podendo resultar em envolvimento psicológicos, que refletem no campo social e econômico, uma vez que, geralmente pode ser considerada uma doença ocupacional (OMS 2017). Diante disso, uma das principais propostas da OPAS/OMS é o controle e eliminação da doença como problema de saúde pública em áreas endêmicas até 2030 (OMS, 2020), reforçando a necessidade do desenvolvimento de ações que visem o diagnóstico precoce e tratamento.

**Figura 2:** Prevalência da Leishmaniose Tegumentar no Brasil no ano de 2019- 2021.



**Fonte:** Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de Informação Regional de Leishmanioses nas Américas, 2022.

Em Pernambuco (PE), a doença é incidente em todo o Estado, com a maior predominância de casos encontrados na Zona da Mata, representando cerca de 60% das notificações reportadas (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2009; NEGRÃO; FERREIRA, 2018). Por ser uma doença de notificação compulsória, todo caso confirmado deve ser notificado e investigado pelos serviços de saúde, por meio da ficha de investigação padronizada pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). No período de 2010 a 2018, 3.147 casos de LT foram confirmados em Pernambuco, segundo o (SINAN-NET), e conforme a Secretária Estadual de Saúde do Estado, no ano de 2020, 142 casos foram registrados, com taxa de incidência de 2,1 casos por 100 mil habitantes.

## 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

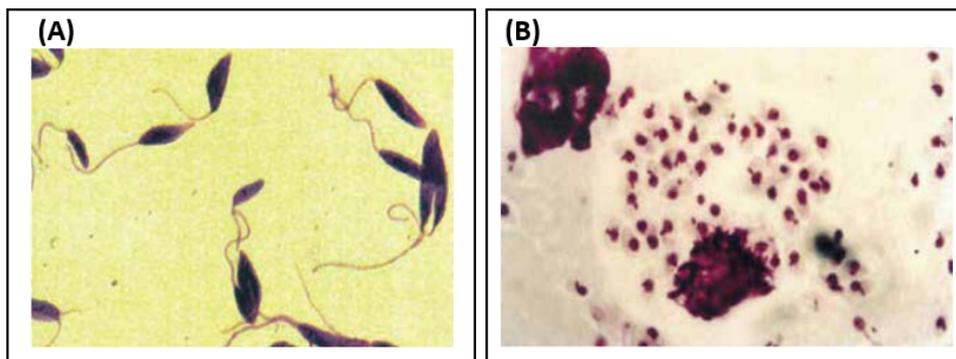
Os parasitos relacionados com as Leishmanioses fazem parte do reino Protista, filo Euglenozoa, ordem *Kinetoplastida* e família Trypanosomatidae. Cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania* já foram descritas como causadoras de doenças em humanos (OPAS/OMS, 2019) e encontram-se agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (SINGH *et al.*, 2006).

No Brasil, sete, do número total de espécies causadoras da Leishmaniose, foram identificadas como as principais causadoras da LT em humanos, seis delas fazem parte do subgênero *Viannia*. As espécies desse subgênero são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, como também as mais recentemente identificadas nas regiões Norte e Nordeste, *L. (V.) lainson*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*. Dentre essas espécies, a *L. (V.) braziliensis* foi considerada a principal espécie circulante em amostras isoladas de pacientes residentes de áreas endêmicas (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; DE ARAÚJO *et al.*, 2022; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010; SILVA *et al.*, 2022). Em relação às espécies encontradas no Brasil, apenas uma é pertencente ao subgênero *Leishmania*, a *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017).

Os parasitos de *Leishmania* encontrados em hospedeiros mamíferos são digenéticos e apresentam durante seu ciclo de vida duas formas evolutivas: A forma promastigota (figura 3A), é extracelular, medindo cerca de 20-30 µm e apresenta morfologia alongada devido à presença de um flagelo livre que possibilita sua mobilidade no aparelho digestivo do vetor invertebrado; e a forma intracelular,

amastigota (figura 3B), com aproximadamente 2-4  $\mu\text{m}$ , apresenta-se como corpos ovais ou arredondados, nos quais podem ser identificados um núcleo, um cinetoplasto puntiforme e um flagelo interno, este último visível apenas ao microscópio eletrônico. A forma intracelular da *Leishmania* é encontrada no interior do sistema reticuloendotelial do hospedeiro, bem como em esfregaços e biópsias (DE VRIES, 2022).

**Figura 3:** Formas evolutivas do parasito *Leishmania* spp.



**Fonte:** Adaptado BRASIL, 2017.

**Nota:** Formas promastigotas encontradas parasitando no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (A). Formas amastigotas encontradas parasitando macrófagos do hospedeiro vertebrado (B).

### 2.3 VETOR

A principal forma de transmissão conhecida das Leishmanioses é a vetorial, embora transmissão congênita, sexual e por exposições ocupacionais tenham sido relatadas (BOEHME *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2012; SIVAKUMAR R, 2004). Além dessas, na literatura também já foram documentados 11 casos de transmissão por transfusão sanguínea (JIMENEZ-MARCO, T. *et al.*, 2016), e casos após transplante renal (YAICH *et al.*, 2022).

Os vetores das Leishmanioses são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília *Phlebotominae* e gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (SVS/MS, 2017). No continente Americano, o gênero associado à transmissão da LT é o *Lutzomyia*, apresentando espécies distribuídas desde o Canadá até a Argentina.

No Brasil, destacam-se as espécies: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia migonei* (AZEVEDO *et al.*, 1996; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; BRASIL,

2017). As espécies *Lutzomyia*, a depender da localização geográfica, podem ser popularmente conhecidas por diferentes nomes, como birigui, mosquito-palha, tatuquira, entre outros (BRASIL, 2017).

Os flebotomos são insetos pequenos, com cerca de 3mm de comprimento, apresentando corpo e asas peludas (Figura 4). A alimentação do inseto costuma incluir fontes vegetais de açúcar, como a seiva, entretanto, as fêmeas também necessitam se alimentar de sangue, considerada uma fonte proteica essencial para a produção de ovos (FORATTINI, 1973). Dessa forma, apenas as fêmeas são hematófagas, apresentando papel importante na perpetuação da doença em humanos e/ou outros animais.

**Figura 4:** Fêmea de flebotomíneo



**Fonte:** Collins, 2011.

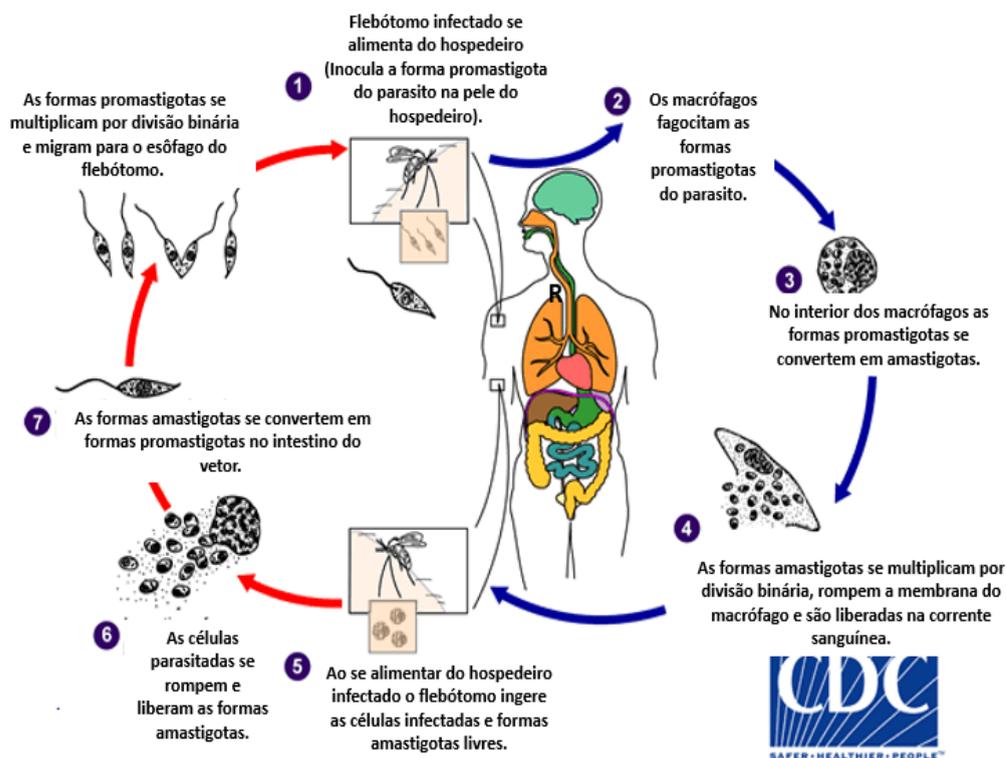
#### 2.4 CICLO DE VIDA DO PARASITO

Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas alimentam-se do sangue do hospedeiro vertebrado e inoculam a forma promastigota do parasito, juntamente com a saliva do vetor, na corrente sanguínea do hospedeiro (DIVENUTO *et al.*, 2023).

Após a inoculação da *Leishmania* na corrente sanguínea, ocorre o recrutamento de células do sistema imune e os parasitos são fagocitados por macrófagos. No interior dessas células, ocorrem mudanças morfológicas no parasito, resultando na forma amastigota (STEBUT; TENZER, 2018). Após o estabelecimento das formas amastigotas nos macrófagos, elas sobrevivem e multiplicam-se por divisão binária, até o momento em que os macrófagos repletos

de parasitos sejam rompidos, liberando-os para a corrente sanguínea do hospedeiro, onde irão infectar outras células (MICHALICK; GERANO, 2005). A sobrevivência do parasito em ambientes tão diferentes, como o intestino do vetor e macrófagos, deve-se aos mecanismos capazes de neutralizar a ação de fatores microbicidas do hospedeiro, assim como contornar a resposta imune, possibilitando sua progressão em ambientes extremos (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012). Uma vez que o parasito atinge a corrente sanguínea do hospedeiro, o vetor ainda não infectado, ao alimentar-se deste hospedeiro, poderá ingerir as formas amastigota que segue até a luz do trato gastrointestinal do inseto vetor e converte-se novamente em promastigotas, reiniciando o ciclo (BRASIL, 2017; DESJEUX *et al.*, 2004; NEVES *et al.*, 2009; REITHINGER *et al.*, 2007). O ciclo de vida do parasito é representado na figura 5.

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



**Fonte:** Adaptado. Centers for Disease Control and Prevention Image Library. 2017

## 2.5 RESPOSTA IMUNE

A resposta imunológica inata é iniciada principalmente por células, como neutrófilos, macrófagos, células Natural Killer (NK) e células dendríticas, em que

constituem a primeira linha de defesa apresentada pelo indivíduo contra a *Leishmania* (CARVALHO *et al.*, 2022).

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o local da infecção. Seu papel contra a *Leishmania spp.* pode variar a depender de fatores como: a espécie do parasito envolvido na infecção, o vetor (fatores de virulência, tropismo e a quantidade de parasito inoculada), como também, àqueles ligados ao hospedeiro, como, sistema imune, estado nutricional e fatores genéticos (BHARATI, 2022; HURRELL *et al.*, 2016; MOLLINEDO *et al.*, 2010; OUALHA *et al.*, 2019). Enquanto alguns trabalhos relatam um papel benéfico dos neutrófilos para o hospedeiro, promovendo a eliminação do parasito (DE SOUZA CARMO, 2010; NOVAIS, F. O *et al.*, 2009), outros propõem sua contribuição na patogênese, possibilitando a multiplicação do parasito em outras células fagocíticas e, atuando assim, como “Cavalos de Troia” (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; DUBIE *et al.*, 2020). Sugere-se que a modulação dos neutrófilos para uma resposta mais permissiva à infecção seja direcionada por mecanismos de proteção desenvolvidos pela *Leishmania spp.*, como, inibição da fagocitose e prevenção do estresse oxidativo (LAUFS *et al.*, 2002; MORADIN; DESCOTEAUX., 2012).

As células Natural Killer (NK), assim como os neutrófilos, desempenham seu papel no início da infecção (BOGDAN, 2012). As células NK são conhecidas por sua capacidade de causar eliminação direta da célula infectada por meio da liberação de granzima e perforina, promovendo a lise osmótica (DOS SANTOS; GEDAMU, 2019). Na Leishmaniose, além do seu potencial citotóxico, estudos destacam uma ação protetora dessas células, mediante o desenvolvimento de uma resposta do tipo TH1, a partir da produção de citocinas como TNF e IFN- $\gamma$  (BOGDAN, 2012; CAVALCANTE *et al.*, 2022)

Outra célula com importante função fagocítica são os macrófagos. Essas células apresentam-se como as principais contribuintes para o desenvolvimento e replicação do parasito, visto que é em seu interior que ocorre a conversão da forma promastigota do parasito para a amastigota (CONDE *et al.*, 2022). Os principais mecanismos leishmanicidas dos macrófagos são a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (CARVALHO *et al.*, 2022), consideradas respostas importantes para a eliminação do parasito sem causar danos na célula hospedeira. Duas subpopulações de macrófagos já foram bem documentados, sendo elas M1 e M2 (TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2018). A subpopulação M1 são

células fagocíticas conhecidas por sua característica pró-inflamatória, apresentando alta atividade antimicrobiana associados com o controle da infecção (TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2018; SERRANO-COLL *et al.*, 2021); enquanto o subconjunto M2 apresenta um fenótipo imunomodulador, relacionado ao reparo tecidual de forma que possibilitam a sobrevivência e proliferação parasitária (TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2018; SERRANO-COLL *et al.*, 2021)

As células apresentadoras de antígenos (APCs) como, por exemplo, as células dendríticas, em sinergia com as células fagocíticas da resposta inata promovem a transição para a resposta adaptativa (MARTIN-GAYO; YU, 2019). Na Leishmaniose, após o reconhecimento e a fagocitose do parasito essas células migram para os órgãos linfoides secundários, onde será realizado o processo de apresentação de antígenos aos linfócitos T *naive* (TIBÚRCIO *et al.*, 2019). As APCs são de suma importância, visto que atuam promovendo a interação entre a resposta imune inata e adaptativa (TASLIME *et al.*, 2022). Dessa forma, em estágios mais avançados da doença, o desfecho da infecção será determinado pela interação dos componentes de ambas as repostas imunes.

Os conhecimentos acerca dos processos envolvidos na resposta imune celular foram obtidos principalmente por estudos *in vitro* utilizando camundongos infectados por *Leishmania spp.* (CARVALHO *et al.*, 2022; LOCKSLEY, 1991). Embora os eventos imunológicos presentes na doença sejam bastante complexos, já foi observado que o desfecho positivo da infecção é baseado na resposta imune celular, principalmente pela ativação e diferenciação de linfócitos T (BACELLAR *et al.*, 2002). Em modelos experimentais, observou-se que o desenvolvimento de linfócitos TCD4<sup>+</sup> do tipo TH1 estão associados com uma resposta protetora, enquanto o tipo TH2 contribui para a susceptibilidade (BACELLAR *et al.*, 2002; DE LUCA; MACEDO, 2016). Na resposta protetora desenvolvida por células TH1, estão relacionadas citocinas, como, IL-12, TNF e IFN- $\gamma$  (ROGERS *et al.*, 2002), já as células que apresentam o perfil TH2, possibilitam a multiplicação parasitária e são caracterizadas pela secreção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 (REIS *et al.*, 2007). Entretanto, a dicotomia TH1/TH2 não se encontra bem estabelecida em humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2014; WIJESOORIYA *et al.*, 2023).

As células TH17 representam um subtipo das células TCD4<sup>+</sup> responsáveis pela secreção da IL-17, uma citocina pró-inflamatória que pode atuar promovendo a atração dos neutrófilos para o local da infecção, além de participar da expressão de

outras citocinas como, IL-6 e IL-8 (STOCKINGER; VELDHOEN, 2007). No contexto da Leishmaniose, Anderson e colaboradores (2009), observaram que camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* desenvolviam lesões mais graves associadas ao aparecimento das células TCD4+ e a citocina, IL-17.

Para ocorrer um equilíbrio dos mecanismos desenvolvidos pela imunidade celular, participa dessa regulação outro subtipo de célula T CD4+, as células T regulatórias (Tregs), associadas a 2 marcadores principais: CD25 e *forkhead box P3* (Foxp3+). Na Leishmaniose, em PBMCs isoladas de pacientes com LT causada por *L. braziliensis*, foi observado a participação positiva das células Tregs, induzindo um aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e o TGF- $\beta$ , sendo a IL-10 a principal (COSTA *et al.*, 2013). Entretanto, em modelos experimentais utilizando *L. major*, foi documentado o estabelecimento de uma infecção crônica (DAYAKAR *et al.*, 2019). Dessa maneira, observa-se que a resposta desempenhada pelas células Tregs pode ser modulada pela espécie de *Leishmania* presente no momento da infecção (CASTRO *et al.*, 2023).

Na imunidade humoral, além da produção de anticorpos observados em PBMCs de pacientes com Leishmaniose, já foi documentada a participação das células B na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, como IFN- $\gamma$ , TNF, IL-13 e IL-6 (REIS, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos realizados com diferentes formas clínicas da doença, causadas por diferentes espécies, relataram que a presença de altos níveis de anticorpos foram associados com o aumento da gravidade da doença (BUXBAUM; SCOTT, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2020; KIMA *et al.*, 2000). Por outro lado, já foi observada a ação de anticorpos *anti-Leishmania* promovendo a lise de formas promastigotas do parasito em sinergia com o sistema complemento, facilitando o processo de fagocitose (FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012; PEDRAS *et al.*, 2003).

Embora o papel dos anticorpos não se encontre bem estabelecido, é possível encontrar sua participação em todas as manifestações clínicas da LT (TRUJILLO *et al.*, 2000). Além disso, sabe-se que a intensidade da resposta humoral encontra-se diretamente relacionada com a carga parasitária e a cronicidade da doença (REIS *et al.*, 2007; TRUJILLO *et al.*, 2000). Dessa maneira, observa-se a frequência da participação das células B nas mais diversas formas clínicas da LT, podendo ser utilizadas como alvos direcionados para modulação da resposta imune,

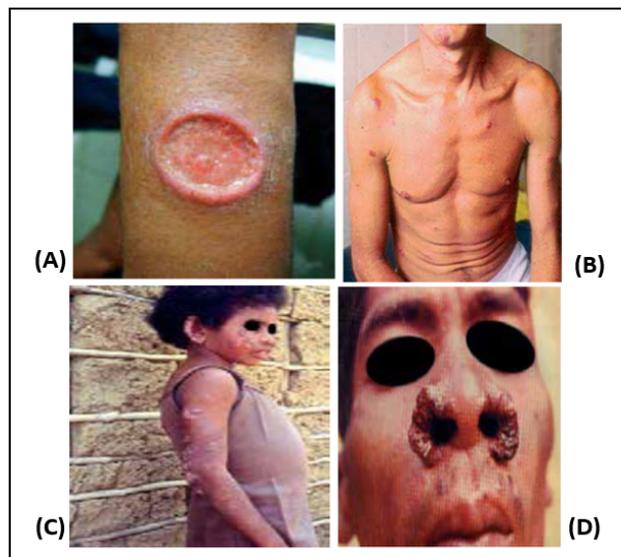
possibilitando, assim, sua aplicação como estratégia terapêutica (RODRIGUEZ-PINTO; SARAIVA; MCMAHON-PRATT, 2014; TAVARES., 2017).

De forma geral, observa-se na Leishmaniose que os mecanismos imunológicos desenvolvidos contra o parasito não podem ser generalizados como benéficos para resolução da infecção ou progressão dela, visto que o papel apresentado por cada célula e citocinas participantes são relacionados e direcionados por diferentes fatores relacionados ao parasito e/ou hospedeiro. Sendo assim, uma mesma citocina pode desenvolver um mecanismo de eliminação do patógeno, assim como, pode favorecer sua proliferação em outra forma da doença (DIVENUTO *et al* 2023; WIJESOORIYA *et al.*, 2023).

## 2.6 FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA

Diferentes quadros clínicos são observados na LT, assim como, casos de infecções assintomáticas (AMEEN, 2010; BRASIL, 2017) (FIGURA 6). Na forma assintomática da doença, ocorre uma exposição do indivíduo acometido ao parasito, porém não há desenvolvimento de lesões e o diagnóstico é realizado por meio da sorologia positiva ao agente infeccioso (DESJEUX, 2004; ROSALES-CHILAMA *et al.*, 2015).

**Figura 6:** Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana



**Fonte:** Adaptado BRASIL, 2017.

**Legenda:** A- Forma localizada da LT; B- Forma Disseminada da LT; C- Forma Difusa da LT; D- Forma Mucocutânea da LT.

A forma clínica localizada é considerada a manifestação mais comum, acometendo cerca de 90% dos indivíduos residentes em áreas endêmicas (CARVALHO *et al.*, 2022). A lesão desenvolvida na forma localizada apresenta-se como uma pápula eritematosa inespecífica que, nessa forma clínica, geralmente observa-se lesão única ou, no máximo, duas lesões. O desenvolvimento da lesão pode ocorrer ao longo de semanas ou meses, na região de inoculação do parasito pelo vetor (MOKNI, 2019). Normalmente, nessa manifestação são encontrados poucos parasitos e apresenta tendência para a cura espontânea ou uma boa resposta ao tratamento (BRASIL, 2017; REIS *et al.*, 2007).

A forma disseminada da LT representa apenas 2% dos casos (BRASIL, 2017). Nessa manifestação, observam-se numerosas lesões espalhadas pelo corpo, estas podendo variar de 10 até mais 1000 (MOKNI, 2019). Em geral, as lesões não apresentam relação com o local em que houve a picada do inseto. Embora as lesões estejam espalhadas em diferentes partes do corpo, observa-se no diagnóstico uma população parasitária rara ou ausente (REIS *et al.*, 2007). Diferentes espécies de *Leishmania spp.* já foram associadas com a forma disseminada, porém, a *L.(V.) braziliensis* é a espécie relacionada com o maior número de casos no Brasil (BRASIL, 2017; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; REITHINGER *et al.*, 2007).

Indivíduos acometidos pela Leishmaniose cutânea difusa inicialmente desenvolvem lesão com um único nódulo não ulcerado, ocorrendo posteriormente evolução para múltiplas lesões nodulares espalhadas por toda a pele (FRANÇA-COSTA *et al.*, 2012). Nesta forma rara da doença, ocorre um crescimento descontrolado do parasito, entretanto, poucos ou nenhum parasito são encontrados no tecido cutâneo (GUIMARÃES *et al.*, 2009). No Brasil, a principal espécie relacionada com o desenvolvimento dessa forma é a *L. (L.) amazonensis* (GOMES *et al.*, 2014).

A LM é considerada a forma mais grave da LT. A evolução para essa manifestação clínica pode surgir meses ou anos após o aparecimento da lesão cutânea (AMATO *et al.*, 2008; CHAPPUIS, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010). Um dos fatores contribuintes para o avanço dessa forma clínica, além de fatores imunológicos, deve-se ao diagnóstico tardio (CARVALHO *et al.*, 2022). No Brasil, a principal espécie associada a essa forma clínica é a *L. (V.) braziliensis* (MEDEIROS;

SILVA; ROSELINO, 2008). As lesões observadas nessa forma clínica são caracterizadas pela destruição das mucosas, principalmente boca e nariz (REIS *et al.*, 2007). Na fase mais avançada da LM, pode-se observar ruptura do septo nasal (CARVALHO *et al.*, 2022). Apesar do dano tecidual exacerbado, poucos parasitos são encontrados no tecido (CARVALHO *et al.*, 2022).

## 2.6 TRATAMENTO

Para o tratamento da LT, a recomendação da OMS é que o mesmo seja realizado conforme a forma clínica da doença, atrelado ao diagnóstico laboratorial, e que sejam obedecidos aos critérios estabelecidos para cada situação (BRASIL, 2017). O tratamento da infecção é baseado na eliminação das formas intracelulares do parasito (amastigotas), sendo esse um dos principais desafios, visto que para isso, é necessário que a droga acumule-se nos macrófagos e elimine os parasitos sem causar danos citotóxicos ao hospedeiro (ASSOLINI *et al.*, 2022).

Os fármacos de primeira escolha, há mais de 70 anos, são os antimoniais pentavalentes. O medicamento está disponível sob duas formulações: o antimoniato de meglumine/antimoniato de N-metilglucamine (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®, não comercializado no Brasil) (BRASIL, 2017). Por apresentarem um mecanismo de ação que interfere na bioenergética das formas amastigotas, mediante a inibição da glicólise e oxidação dos ácidos graxos, essas drogas são consideradas “leishmanicidas” (GONTIJO; CARVALHO, 2003; EVANS; KEDZIERSKI, 2012).

O esquema terapêutico estabelecido pela OMS recomenda que a dose do fármaco seja calculada em miligramas de antimônio pentavalente ( $Sb^{+5}$ ) por quilograma de peso corporal por dia ( $mg\ Sb^{+5}/kg/dia$ ), sendo a dose recomendada de 15  $mg/kg/dia$  por 20 dias para LT localizada e disseminada, e 20  $mg/kg/dia$  durante 30 dias, para a LM. A administração da droga deve ser realizada por via intramuscular ou endovenosa, sob acompanhamento médico (BRASIL, 2017).

Diferentes efeitos adversos, como: náuseas, vômitos, dor abdominal, mialgia, insuficiência renal aguda, podem ser observados durante o tratamento com esses fármacos, com intensidade variando de leve a moderada (BRASIL, 2017). Entretanto, particularmente na dose administrada de 20  $mg\ Sb^{+5}/kg/dia$  já foi observado que o antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade, levando a alterações mais graves que podem inviabilizar a continuidade ao tratamento

(BRASIL, 2017). Em casos de reações adversas mais graves ou potencialmente graves, a OMS recomenda que seja realizada a notificação às autoridades sanitárias. Ademais, além dos efeitos colaterais apresentados, outras limitações podem interferir na adesão do paciente ao tratamento, como a longa duração dos ciclos de uso do medicamento e as vias necessárias para administração.

A Anfotericina B e a Pentamidina são as drogas utilizadas em casos em que os fármacos de primeira escolha não atingiram os resultados esperados ou na sua impossibilidade (BASANO, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; DIRO *et al.*, 2015; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Estudos realizados *in vitro*, utilizando camundongos infectados com *Leishmania spp.* destacaram destruição intra e extracelular do parasita após administração da anfotericina B, porém, por ser uma droga que apresenta alta toxicidade e está relacionada com diferentes reações adversas (febre, cefaleia, leucopenia, hipotensão, hipomagnesemia, distúrbio de comportamento, calafrios, náuseas, vômitos), é necessário o acompanhamento médico (FALCI; PASQUALOTO, 2015). Além disso, em casos de necessidade de administração sequencial da anfotericina B após o uso do antimoniato de meglumina, recomenda-se que o fármaco de segunda escolha seja administrado apenas após 14 dias do término do tratamento com o fármaco de primeira escolha, para evitar que ocorreram efeitos adversos graves, sobretudo efeitos cardíacos (BRASIL, 2017).

Em relação a Pentamidina, seu primeiro uso no tratamento da forma cutânea da Leishmaniose parece ter sido ocorrido na década de 1970. Embora seu mecanismo de ação não seja bem estabelecido, parece que essas drogas interferem criticamente na função do DNA, RNA e biossíntese proteica do parasito (SANDS *et al.*, 1987). Além disso, estudos apontam essa droga como uma boa opção de tratamento para *L. guyanensis* e *L. panamensis* (GADELHA, 2018; PICCICA *et al.*, 2021). Sua administração ocorre por via intramuscular/intravenosa e assim como os outros fármacos, também pode apresentar efeitos colaterais, como: e náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (BRASIL, 2017; PRADHAN *et al.*, 2022), que podem variar de leve a moderado.

Outra abordagem que vem sendo explorada como alternativa aos fármacos convencionais é a imunoterapia e/ou imunoquimioterapia (PRADHAN *et al.*, 2022). Essa abordagem vem ganhando destaque uma vez que pode atuar modulando o

sistema imune do hospedeiro, redirecionando a resposta imunológica (CARVALHO, 2021). Abordagens aplicando antígenos recombinantes de *Leishmania spp.* têm sido testados como candidatos à imunoterapia. Para pacientes com resistência aos antimoniais, a associação entre antimoniais e imunomoduladores tem sido observada como tratamento alternativo (SCHWARTZ, J, 2017; TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S., 2018). Embora seja uma modalidade promissora, mais estudos são necessários para direcionar sua aplicação na rotina clínica.

## 2.7 DIAGNÓSTICO

Uma das principais medidas de controle das Leishmanioses é centrada no diagnóstico precoce, cuja abordagem possibilita um direcionamento terapêutico preciso e melhor condição de vida para o indivíduo acometido. Embora seja de grande importância uma técnica que apresente bom desempenho, para o diagnóstico da LT ainda não existe uma técnica considerada o padrão ouro. Dessa forma, o diagnóstico final é obtido mediante associações de características clínicas, epidemiológicas (localidade, ocupação, sexo e idade do indivíduo) e técnicas laboratoriais (GONTIJO; CARVALHO, 2003; DE BRITO, 2020; NEVES, 2002).

O diagnóstico clínico é realizado a partir das características da lesão apresentada pelo indivíduo acometido (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Uma das principais problemáticas em relação à avaliação com base nessas características clínicas deve-se ao amplo espectro de manifestações observadas na LT, podendo ser facilmente confundida com outras doenças que acometem a derme, como a esporotricose, tuberculose cutânea, psoríase, infecções micóticas, sífilis, e até mesmo com alguns tipos de carcinomas e linfomas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; PISSINATE *et al.*, 2008; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015).

Sendo assim, um método laboratorial que possa detectar um paciente portador da doença, que apresente boa acurácia e rapidez, torna-se indispensável para o controle da doença. Nessa perspectiva, diferentes testes vêm sendo descritos, com diferentes abordagens, incluindo as parasitológicas, moleculares e também sorológicas (DE BRITO, 2020; GOTO, H.; LINDOSO, 2010).

Embora essas técnicas apresentem vantagens, a *Leishmania spp.* é um parasito complexo e isso acarreta limitações aos testes, que influenciam diretamente em sua sensibilidade e especificidade. Fatores como: a carga parasitária, a espécie de *Leishmania* presente na infecção, assim como, o tipo de

antígeno utilizado, no caso das abordagens sorológicas, podem interferir no desempenho final de ensaio. Além disso, a sensibilidade pode depender da experiência de cada serviço, a manipulação, assim como, a qualidade dos insumos e equipamentos utilizados (BRASIL, 2017).

Dessa maneira, a seleção do teste a ser utilizado muitas vezes acaba sendo definido com base em características, como infraestrutura e aos recursos disponíveis, e não necessariamente em relação à sua precisão diagnóstica (DE VRIES, 2022).

### 2.7.1 Diagnóstico parasitológico

As técnicas parasitológicas são consideradas boas alternativas para o diagnóstico da Leishmaniose, devido à sua elevada especificidade, embora haja controvérsias quanto a sua sensibilidade (DE VRIES, 2022; GOTO; LINDOSO, 2010). Essa abordagem é baseada na observação das formas amastigotas do parasito a partir de amostras de lesões obtidas por biópsias e escarificações da pele (BRASIL., 2017). Os testes mais utilizados dentro dessa abordagem são: pesquisa direta, isolamento em cultivo *in vitro* ou por inoculação de amostras em animais *in vivo* (DE PAIVA- CAVALCANTI, 2015; DE BRITO, 2020; GOTO; LINDOSO, 2010; MACHADO, 2004).

Os exames diretos são métodos de baixo custo e simples execução, contudo, sua sensibilidade pode variar de 30% a 70% (AL-HUCHEIMI; SULTAN; AL-DHALIMI, 2009; DE BRITO *et al.*, 2020; SCHUBACH *et al.*, 2001). Para essa abordagem, são utilizados os seguintes procedimentos: escarificação da borda da lesão, biópsia e punção aspirativa (BRASIL, 2017). A principal variável presente no método encontra-se relacionada com a quantidade de parasitos, visto que há uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de parasitos na lesão e o tempo de infecção (GUTIERREZ *et al.* 1991). Além disso, é comum observar presença de infecção bacteriana na lesão, dificultando o diagnóstico (FREIRE, 2011).

No isolamento do parasito para cultura *in vitro*, pode ser observado o parasito em sua forma evolutiva amastigota, assim como, posteriormente, pode ser realizada a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida. Entretanto, a sensibilidade é variável e depende de diferentes fatores, como: tempo de evolução da lesão, carga parasitária e a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (DA SILVA *et al.*, 2005).

Além disso, o tempo de análise pode ser variável (horas a semanas) a depender da metodologia utilizada e estrutura laboratorial (DE-BRITO *et al.*, 2020).

A técnica de isolamento por inoculação em animais para cultura *in vivo* é realizada a partir do material obtido por biópsia ou raspado de lesão. Nesse processo, o material será triturado em solução salina estéril e inoculado via intradérmica, no focinho e/ou patas do animal, um exemplo de modelo utilizado para esses estudo são os hamsters. Dessa forma, observa-se que o cultivo *in vivo* necessita de uma metodologia complexa, assim como pode acarretar risco de acidente durante o processo de inoculação, exigindo um profissional com ampla experiência para a execução (GOMES *et al.*, 2009). Além disso, a principal limitação do método está relacionada com o tempo de desenvolvimento da lesão no animal, sendo necessário o acompanhamento de três a seis meses (BRASIL, 2017), somando custos para a manutenção de animais e necessidade de infraestrutura, inviabilizando sua aplicação na rotina.

De maneira geral, a abordagem parasitológica apresenta custos elevados, participação de profissionais capacitados, necessidade de um maior tempo para execução, e manutenção de cultura de parasito, implicando em aumento dos custos. Ademais, as técnicas apresentam dificuldade em sua acurácia, por exemplo, a pesquisa microscópica não permite a determinação da espécie, dificultando a orientação da escolha terapêutica (HODIAMONT *et al.*, 2014).

### 2.7.2 Diagnóstico molecular

As abordagens moleculares vêm sendo amplamente exploradas por apresentarem resultados superiores em relação às outras técnicas descritas, sobretudo no quesito sensibilidade, que podem variar de 91% a 98% (DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; GOTO; LINDOSO, 2010). Essa abordagem é fundamentada em um método direto, baseado na identificação do material genético do parasito, a partir de oligonucleotídios iniciadores (primers) pareados na região de interesse, possibilitando seu uso no diagnóstico mais preciso de diversas doenças infecciosas (GOMES *et al.*, 1999; KOSTYUSHEVA *et al.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2000). Diferentes sequências de *Leishmania spp.* podem ser amplificadas, como:  $\beta$ -tubulina, locus gp63, locus hsp70, proteinases de cisteína e minicírculos de DNA (kDNA) (REITHINGER, 2007; SINGH *et al.*, 2006).

Dentre os métodos moleculares, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR em tempo real (qPCR), são as técnicas mais utilizadas para o diagnóstico da LT (DE-BRITO *et al.*, 2020). Ambas as técnicas apresentam diversas vantagens, como: possibilidade de identificar a *Leishmania spp.* mesmo em situações de baixa carga parasitária, utilização de pouca quantidade de amostras, são técnicas menos invasivas, geram resultados mais rápidos, além de possibilitar a utilização de diferentes materiais biológicos obtidos de pele e mucosa (BRASIL, 2017; GALLUZZI *et al.*, 2018).

Por outro lado, algumas limitações práticas são encontradas, como, a necessidade de infraestrutura laboratorial, profissionais qualificados e a ausência de uma metodologia padrão para a realização do método nos diferentes laboratórios (DE-BRITO *et al.*, 2020; GALLUZZI *et al.*, 2018). Além disso, em locais mais necessitados, esse tipo de abordagem não é viável, visto que geralmente os laboratórios possuem recursos restritos.

### 2.7.3 Diagnóstico sorológico

Os teste sorológicos são métodos indiretos, visto que diferente das outras abordagens centradas na identificação do parasito, as técnicas sorológicas fundamentam-se no reconhecimento da resposta imune celular e/ou humoral (ARONSON; JOYA, 2019). Dessa forma, essa metodologia visa a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* produzidos pelo indivíduo acometido durante a infecção.

Os métodos sorológicos principais para o diagnóstico da Leishmaniose são, principalmente, a imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA - do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Outros menos empregados podem ser utilizados como, Western Blot (WB) e o teste de aglutinação direta (TAD) (DE BRITO *et al.*, 2020). As técnicas sorológicas, de maneira geral, apresentam vantagens como: rápida execução, detecção dos indivíduos acometidos antes do desenvolvimento de lesões, e ainda apresentam a possibilidade de automação (DE BRITO *et al.*, 2020; ZANETTI, A. S. *et al.* 2019).

A técnica de IFI é fundamentada na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, utilizando como antígeno o parasito fixado, normalmente, a forma promastigota (BRITO *et al.*, 2009; LÉVÊQUE *et al.*, 2020). A literatura descreve que a técnica apresenta uma sensibilidade variável, podendo apresentar índices falsos negativos para amostras de pacientes apresentando a forma difusa da doença ou 100%

sensível para a forma mucocutânea (OLIVEIRA, 2016). Por outro lado, algumas limitações são relatadas, como custo relativamente elevado, processo laborioso e com resultados muitas vezes subjetivos que dependem da experiência do profissional, resultando na necessidade de profissionais com grande experiência para execução e leitura das lâminas (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOTO; LINDOSO, 2010; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; LÉVÊQUE *et al.*, 2020). Além disso, já foi relatado com frequência reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, acarretando diagnósticos falso-positivos (BRITO, 2008)

A utilização do teste de Western Blot para diagnóstico da Leishmaniose agrega sensibilidade, podendo alcançar 100% (GOMES *et al.*, 2009). Quando empregada ao diagnóstico da Leishmaniose visceral e mucocutânea em áreas não endêmicas, foi observado um desempenho superior do WB em comparação ao ensaio de IFI (DE BRITO *et al.*, 2020). Por outro lado, de forma geral a técnica apresenta limitações como custo elevado, necessidade de maior infraestrutura laboratorial, além de demandar mais tempo para execução do ensaio (POMARES *et al.*, 2012). Outra limitação do ensaio é que os resultados mostram-se variáveis devido à dificuldade de padronização do antígeno utilizado (LÉVÊQUE *et al.*, 2020).

O teste de aglutinação direta (TAD) é um ensaio semi-quantitativo baseado na reação de antígenos (promastigotas) com anticorpos anti-*Leishmania*, que após o período de incubação, resulta em uma reação de aglutinação (DE OLIVEIRA, 2013). No contexto das Leishmanioses, trabalhos realizados com amostras de pacientes apresentando a forma visceral da doença revelaram sensibilidade e especificidade do teste superiores a 70% (BANGERT *et al.*, 2018; FREIRE *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2013). Entretanto, algumas limitações podem ser encontradas, como a necessidade de cultivo de parasitos vivos para serem utilizados como antígeno, dificuldade nas etapas de padronização, o que pode acarretar variações nos resultados, além de resultados falso-positivos com infecções causadas por outro tripanossomatídeos (BANGERT *et al.*, 2018; LÉVÊQUE *et al.*, 2020; MAIA *et al.*, 2012)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi descrito pela primeira vez por dois grupos independentes, ENGVALL; PERLMANN, 1971 e VAN WEEMEN; SCHUURS, 1971. O teste de ELISA consiste em uma metodologia de realização simples e rápida, com diversas aplicações em pesquisas. Assim como a IFI, a técnica convencional (ELISA indireto) é baseada na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

utilizando como antígeno o parasito fixado. Embora seja uma técnica mais prática, a abordagem convencional é baseada na utilização do parasito fixado como antígeno, implicando custos à técnica devido à necessidade de manutenção de cultura (MACHADO, 2004). Além disso, o ensaio convencional, utilizando o extrato bruto da *Leishmania spp.* como antígeno, apresenta outras limitações como, sensibilidade e especificidade dependente da natureza do antígeno utilizado (TAVARES, 2003). Ademais, a especificidade do teste é amplamente variável, podendo-se observar com frequência resultados falso-positivos devido à reatividade cruzada com outras infecções ocasionadas por microrganismos da família Trypanosomatidae, como a Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral.

O ensaio convencional do ELISA indireto utiliza como antígeno extrato bruto total de proteínas do parasito, geralmente obtido por etapas repetidas de congelamento e descongelamento, seguido de centrifugação (LÉVÊQUE *et al.*, 2020). O desempenho em relação aos parâmetros de sensibilidade e especificidade parecem estar relacionados ao tipo de espécie a ser utilizada como antígeno. Para antígeno bruto, proveniente da *L. infantum* estudos revelaram que a sensibilidade e especificidade do ensaio variam de 40% a 96,7% e de 63% a 100%, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2018; DUARTE *et al.*, 2017; LÉVÊQUE *et al.*, 2020; MAGALHÃES *et al.*, 2017). Já os ensaios realizados com as espécies *L. major* ou *L. braziliensis*, apresentaram um desempenho inferior, com sensibilidade variável de 1% a 87% e especificidade de 21,3% a 100% (CELESTE *et al.*, 2014; DIAS *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Diante das limitações e heterogeneidade dos resultados encontrados na abordagem convencional do ELISA, diversos trabalhos vêm explorando outras alternativas antigênicas. Uma dessas alternativas é o uso de proteínas recombinantes obtidas *in silico* que resultou em uma nova e poderosa estratégia para melhorar o desempenho dos métodos convencionais de diagnóstico (REITER-OWONA *et al.*, 2015; REZENDE *et al.*, 2012; ZANETTI *et al.*, 2019). Pesquisas recentes sugerem que a incorporação de preparações específicas de antígenos recombinantes de *Leishmania* em ensaios sorológicos aperfeiçoariam características operacionais dos testes DE BRITO *et al.*, 2020; DE VRIES *et al.*, 2015).

Vários estudos têm tentado aprimorar os métodos convencionais, principalmente o teste ELISA, incorporando essas novas moléculas, com resultados

satisfatórios de sensibilidade e especificidade. A utilização de proteínas recombinantes como antígeno, além de aumentar a precisão do teste e melhorar a reprodutibilidade, mostraram-se capazes de identificar pacientes assintomáticos (GALVANI *et al.*, 2021; LÉVÊQUE *et al.*, 2020). Uma proteína recombinante bem caracterizada e utilizada é a K39 (rK39) que revelou resultados com 100% de especificidade e 96% de sensibilidade para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral (LV) (LEMOS; CARVALHO; DIETZE, 2003).

No contexto da LT, a proteína recombinante rLbk39 de *L. (V.) braziliensis* apresentou bom desempenho quando utilizada no ensaio de ELISA, apresentando sensibilidade de 88% e especificidade de 98% para LT (DE SOUZA *et al.*, 2019). Outra proteína com bom desempenho diagnóstico é a proteína recombinante de choque térmico 83 (HSP – do inglês *Heat Shock protein*), que demonstrou boa sensibilidade e especificidade, no diagnóstico de diferentes formas clínicas da Leishmaniose, como: LC, LM e LV (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014). O estudo foi comparado com o ELISA utilizando antígeno bruto de *L. major* (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOMES *et al.*, 2014; GOTO; LINDOSO, 2010; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Dessa forma, compreende-se que a escolha de potenciais antígenos mais específicos para a forma clínica e as espécies envolvidas é uma estratégia potente, pois são elementos essenciais para a determinação da doença nos pacientes e, conseqüentemente, seu tratamento.

## 2.8 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA APLICADAS AO IMUNODIAGNÓSTICO DA LT

A bioinformática é um campo da ciência que vem gerando um grande impacto em pesquisas, visto que a aplicação dessas ferramentas possibilita a escolha mais racional da molécula de interesse o que, conseqüentemente, gera resultados mais sensíveis e específicos (BYRNE ; SCHNEIDER, 2019). Com a expansão da bioinformática foi possível originar um novo ramo da imunologia, a imunoinformática, que visa uma melhor interpretação de dados e de forma otimizada (YOON *et al.*, 2017). A junção das áreas possibilita a avaliação mais precisa de moléculas e processos envolvidos na imunidade em diferentes níveis, como: estrutural, funcional, e interações moleculares (PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2012; TOMAR, 2010).

Uma das aplicações dessa abordagem é a predição *in silico* de possíveis epítomos antigênicos/imunogênicos. A identificação de novos epítomos é de grande interesse visto que direcionam melhor compreensão etiológica de doenças, monitoramento imunológico, criação de vacinas e otimização de ensaios de diagnóstico (BECK *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). Assim, abordagens utilizando ferramentas computacionais podem ser integradas às técnicas diagnósticas com o intuito de elevar a sensibilidade e especificidade dos testes a partir da identificação, caracterização ou predição de epítomos reconhecidos por células B e T (PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2012; THOMAZ-SOCCOL, 2018).

Uma das principais dificuldades durante a busca por novos epítomos encontra-se centrada na identificação da região antigênica, responsável por promover a ativação do sistema imunológico (YAO *et al.*, 2012). Isso porque os antígenos expressos na superfície de patógenos, ainda são componentes essenciais para otimização de testes de diagnóstico utilizados na rotina laboratorial. Com isso, etapas de identificação e seleção de antígenos são essenciais para garantir um bom desempenho dos testes (NOYA, O. *et al.*, 2003). Além de resultar ganhos significativos nos testes laboratoriais, essa abordagem apresenta outras vantagens práticas, como: baixo custo, facilidade de armazenamento e transporte, além da possibilidade de produção em larga escala (LANGEL, 2019).

Diversos trabalhos vêm aplicando essa abordagem no diagnóstico de diferentes doenças, como tuberculose, HIV e filariose humana (MISHRA *et al.*, 2017; PANDIARAJA *et al.*, 2010). O emprego dessas moléculas possibilita a identificação de anticorpos contra um determinado agente infeccioso a partir da análise de amostras do indivíduo acometido (GOMARA; HARO, 2007). No contexto da LT, por ainda não existir uma técnica considerada padrão-ouro, existe a necessidade de desenvolver um método que apresente melhor precisão (DE VRIES; SCHALLING, 2022). Uma das aplicações mais utilizadas na rotina laboratorial são as abordagens sorológicas, entretanto, esses testes apresentam variações em seu desempenho, além da frequente presença de reações cruzadas com infecções semelhantes (DE BRITO *et al.*, 2020).

Visando o aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico da Leishmaniose, nosso grupo vem empregando o uso de ferramentas *in silico*. De maneira geral, observam-se diversos trabalhos explorando abordagens *in silico* visando um

diagnóstico mais sensível e específico da Leishmaniose (FLOWER; DOYTCHINOVA, 2002; PEREIRA, 2020; THOMAZ-SOCCOL, 2018).

Um dos principais resultados dessa linha de pesquisa, foi a identificação de duas proteínas recombinantes a partir da análise *in silico* do proteoma predito de *L. (V.) braziliensis* identificadas como, Lbrm0750 e Lbrm1140 (devido à origem de seus genes), apresentando potencial para diagnóstico da LT a partir da análise de sequências específicas de células B (TAVARES, 2017).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a proteína recombinante Lbrm0750 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no ensaio de ELISA visando aperfeiçoar um método de diagnóstico para a Leishmaniose Tegumentar.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Realizar a obtenção do antígeno recombinante Lbrm0750 de *L. (V.) braziliensis*;
- II. Otimizar o protocolo dos ensaios de ELISA com o uso do antígeno recombinante Lbrm0750;
- III. Avaliar a aplicabilidade do ensaio de ELISA utilizando o antígeno recombinante Lbrm0750 na identificação de pacientes portadores de LT ativa;
- IV. Comparar o desempenho da performance do ELISA utilizando o antígeno recombinante e o extrato bruto da *L. (V.) braziliensis* na detecção de pacientes portadores de LT ativa.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO**

O presente estudo utilizou amostras de sangue de pacientes portadores de LT (N=50), apresentando lesão ativa da doença e residentes em áreas endêmicas de Pernambuco. Os pacientes, de ambos os sexos e idades variáveis, foram recrutados por conveniência. O atendimento de cada paciente foi realizado por uma médica dermatologista do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), nos postos

de saúde do município, onde foi realizada a anamnese e a coleta de amostras. O atendimento e coleta foi realizado em parceria com o Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães (SRL/IAM - Fiocruz/PE). Para o grupo controle, foram utilizadas amostras (N=28) de indivíduos saudáveis para LT, residentes de áreas não endêmicas. O material coletado foi processado no laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM) do Instituto Aggeu Magalhães- IAM/FIOCRUZ-PE, na cidade de Recife-PE.

#### 4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/FIOCRUZ (CAAE 11083812.7.0000.5190) (ANEXO A). Os procedimentos para coleta de sangue somente ocorreram após os participantes concordarem em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE). Os procedimentos metodológicos do presente projeto estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, conforme o código de ética, resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e complementares. Garantimos o sigilo e anonimato relacionado às informações obtidas na pesquisa, respeitando as recomendações da resolução.

#### 4.3 EXAMES LABORATORIAIS DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES

A confirmação da doença foi realizada por meio de exames laboratoriais, em parceria com o Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) e incluíram: pesquisa direta; punção aspirativa para inoculação em hamster; biópsia; e reação em cadeia de polimerase (PCR). Participaram do estudo, apenas aqueles que apresentaram diagnóstico positivo para LT em pelo menos dois testes laboratoriais.

#### 4.4 OBTENÇÃO DO PLASMA

A partir do sangue coletado, o plasma foi obtido após centrifugação a 400g por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o plasma foi coletado, aliquotado em microtubos, identificado e estocado a -20°, até sua utilização.

#### 4.5 OBTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) BRAZILIENSIS*

Inicialmente, a partir de uma alíquota de formas promastigotas da *L. (V.) braziliensis* da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903), mantida *in vitro*, foi realizada uma expansão em meio Schneider's suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico até atingir a fase exponencial. Em seguida, os parasitos foram transferidos para tubos de 50ml e submetidos à baixa centrifugação (100 X g) temperatura ambiente por 10 minutos. Para a recuperação dos parasitos do sobrenadante, foram realizadas três etapas de lavagens em solução salina tamponada (PBS) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), nas condições de 4°C, 800 X g durante 10 minutos. O sedimento formado foi homogeneizado cuidadosamente. Por fim, a alíquota de parasitos da suspensão foi contada utilizando câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para os ensaios.

#### 4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *L. (V.) BRAZILIENSIS*

Para esse processo, foram utilizadas as formas promastigotas do parasito mantidas *in vitro* (Descritas no item 4.5).

Os parasitos foram transferidos para tubos cônicos de 50ml, e submetido a uma centrifugação de 400 X g por 10 min. Após essa etapa, foram realizadas 3 lavagens com uma solução salina tamponada, 1x e pH 7,2. O pellet formado foi ressuspensão em 750µL da solução tampão de lise branda e 250µL de inibidor de protease. Após essa etapa, o conteúdo foi repassado para microtubos de 1,5mL. Para a etapa de lise celular, foram realizados sucessivos congelamentos e descongelamentos em nitrogênio líquido e banho-maria a 36°C (7x cada etapa). O extrato bruto total do parasito foi quantificado com reagente de Bradford (5µL da suspensão antigênica, 200µL de Bradford e 795µL de água deionizada), obtendo uma quantificação final de 6,986ng/µL. Em seguida, a suspensão foi alíquotada em microtubos de 0,5mL e congelados a -80°C até o uso.

#### 4.7 ORIGEM DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *L. (V.) BRAZILIENSIS*

A proteína recombinante Lbrm0750 foi identificada e descrita em um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, realizado por TAVARES (2017). O objetivo principal desse estudo foi realizar uma análise *in silico* do proteoma predito da *L.*

(*V.*) *braziliensis*, buscando identificar possíveis epítomos imunogênicos e específicos para células B.

Para a identificação dos epítomos, foi inicialmente criado um banco de dados relacional e a ele foram depositados os proteomas de *L. (V.) braziliensis*. Para avaliar o nível de conservação proteica, outras espécies relacionadas foram inseridas: *L. major* e *L. infantum*. Essa seleção foi feita utilizando a ferramenta BLAST (ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica). Assim, foram selecionadas sequências de *L. (V.) braziliensis*, que apresentaram um nível de conservação acima de 70%, entre as outras espécies avaliadas. A seleção de proteínas conservadas em uma espécie é importante visto que indicam maiores chances dessas sequências proteicas apresentarem um papel essencial para o funcionamento daquele organismo (TAVARES, 2017).

O passo seguinte consistiu na avaliação de características que indicassem bons candidatos a epítomos, como nível de similaridade com proteínas de humanos e camundongos, localização celular e presença de hélice transmembrana. Todos esses parâmetros foram selecionados e minuciosamente avaliados visando ao final identificar um antígeno ideal que para esse estudo seria aquele capaz de reconhecer especificamente anticorpos anti-*L.braziliensis* (TAVARES, 2017).

Após a seleção das características desejadas para a proteína, três diferentes algoritmos preditores de epítomos de célula B foram utilizados, o AAP12 (CHEN, *et al.*, 2007), BCPredi12 (EL- MANZALAWY; DOBBS; HONAVAR, 2008) e BepiPred (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006). Esses preditores foram utilizados com o intuito de selecionar antígenos que possuísem o maior número de potenciais epítomos imunogênicos para o diagnóstico da LT. Por fim, as sequências que apresentaram maior quantidade desses epítomos foram enviadas para a síntese, resultando em sequências codificadoras para a proteína recombinante denominada de Lbrm0750.

#### 4.8 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750

A proteína recombinante de *L.(V.) braziliensis* (Lbrm0750) foi obtida conforme o protocolo utilizado por TAVARES (2017). Inicialmente, clones de *Escherichia coli* da linhagem BL21 Star™ (DE3) e a linhagem BL21 (DE3) pLysS, foram transformados com os plasmídeos de expressão, pET21a, contendo o gene da proteína. Para cada linhagem de *E.coli* utilizada, as células transformadas foram separadamente cultivadas em 20 mL de meio Luria Bertani (LB) acrescido de 2µg/ml de ampicilina e

2,5ug/ml de cloranfenicol, onde posteriormente permaneceram sob agitação de 180rpm durante 16 horas a 37°C. Após esse período, foram retirados 10 ml do volume total e adicionados a um Erlenmeyer contendo 250ml de meio LB líquido contendo ampicilina e cloranfenicol nas mesmas concentrações descritas anteriormente. Esse novo recipiente foi deixado sob agitação, até atingir uma densidade óptica (O.D) de 0,7 a um comprimento de onda de 600 nm. Após atingir a OD, foi acrescentado 0,5M do indutor de expressão proteica isopropil-Beta-D-galactosídeo (IPTG), indutor de expressão análogo à lactose, permanecendo em uma incubação por 3 horas sob agitação, testando as condições de temperatura a 18°C e 30°C para cada uma das linhagens de BL21. Para confirmar a expressão da proteína, foi retirado uma alíquota da cultura, e essa foi fracionada em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). A visualização do resultado do gel foi realizada por coloração com o corante Coomassie Blue R-250. Para recuperação da proteína, foi realizada uma centrifugação, e os sedimentos formados foram ressuspensos em 20 mL de tampão de lise e equilíbrio (20 mM fosfato de sódio, 300 mM Tris, 8 M de Uréia, 5 mM de imidazol – pH 8,0). Para realizar a purificação proteica, o conteúdo foi solubilizado por ultra-sonicação, em 6 pulsos de 30 segundos cada, em intervalos de 1 minuto. O material obtido foi centrifugado (12.000 g) por 30 minutos, a uma temperatura de 4°C. Por fim, o sobrenadante foi alíquotado e incubado com 500 µL da resina Ni-NTA agarose (*Qiagen*) pré equilibrada com o tampão de lise e equilíbrio, a 4°C, sob leve agitação. Após essas etapas, a alíquota foi centrifugada a 6000x g por 1 minuto, e o sobrenadante foi armazenado em um tubo cônico e posteriormente, congelado a -80°C. A resina foi lavada 3 vezes com 1ml do tampão de equilíbrio por etapas de suspensão e centrifugação. Além disso, foram realizadas mais duas etapas de lavagem por 5 minutos, utilizando um tampão desnaturante em pH 6,0 (20 mM fosfato de sódio, 300 mM Tris, 8 M de Uréia, 5 mM de imidazol). Em seguida, foi realizada uma etapa de eluição da proteína, utilizando o tampão de eluição (20 mM fosfato de sódio, 300 mM Tris, 8 M de Uréia, 5 mM de imidazol – pH 4,5). Para cada etapa de lavagem realizada, o sobrenadante foi alíquotado e armazenados em uma temperatura de -80°C. Dos produtos obtidos em todas as etapas, foram coletados 10µL, para visualização e conferência em gel SDS-PAGE. Por fim, as proteínas obtidas foram quantificadas segundo protocolo de Bradford (Bradford, 1976).

#### 4.9 ENSAIO DE ELISA UTILIZANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750 DE *L. (V.) BRAZILIENSIS*

O protocolo foi desenvolvido *in house*, no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do IAM. Na primeira etapa, a placa foi sensibilizada com 100µL do antígeno recombinante (0750) previamente diluído em tampão Carbonato/Bicarbonato 0,06 M pH 9,6 e testados nas concentrações previamente estabelecidas de 100ng, 200ng, 400ng e 600ng. Em seguida, a proteína recombinante ficou sob incubação a 4°C por 18 horas. Posteriormente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 0,015 M (pH 7,2), contendo 0,05% de tween 20. Na etapa seguinte, as amostras de plasma dos pacientes foram testadas em quatro diluições (1:200, 1:400, 1:900 e 1:1800). Por fim, a diluição escolhida foi aplicada para a avaliação das amostras. Na etapa seguinte, foram adicionados em cada poço, 100 µL das amostras de plasma diluído dos pacientes e a placa foi incubada por 1 h a 37°C, e em seguida lavada, como já descrito anteriormente. Após às lavagens, foram adicionados 100 µL de anti-IgG humana cadeia gama específica conjugada à peroxidase (Calbioquem, título de 1/2500), seguido de incubação da placa por mais 1h. Posteriormente, a placa foi lavada mais 3 vezes, e, por fim, 150 µL por poço com cromógeno (ácido 5-amino salicílico ou OPD) com peróxido de hidrogênio foram adicionados. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente e na ausência de luz, a reação foi parada com 100µL, por poço, de ácido sulfúrico 1M. Por fim, a leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm.

#### 4.10 ENSAIO DE ELISA UTILIZANDO O EXTRATO BRUTO DE *L. (V.) BRAZILIENSIS*

O ensaio de ELISA foi realizado com o protocolo desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do IAM. Inicialmente, a placa foi sensibilizada com 100µL do antígeno a 500ng/mL, previamente diluído em tampão Carbonato/Bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e a placa foi incubada a 4°C por 18 horas. Após incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 0,015 M (pH 7,2) contendo 0,05% de tween 20. As amostras de plasma dos pacientes foram inicialmente testadas utilizando quatro diluições (1:450, 1:900, 1:1800 e 1:3600) diluídas em PBS 0,015 M pH 7,2 contendo 0,05% de tween20 e 10% de leite em pó desnatado. Por fim, a melhor diluição foi escolhida e utilizadas com as amostras. Foram adicionados, em cada poço, 100 µL das amostras de plasma diluído dos pacientes e a placa permaneceu em incubação por 1 h a 37°C, sendo em seguida lavada como

já descrito anteriormente. Após essa etapa, foram adicionados 100  $\mu$ L de anti-IgG humana cadeia gama específica conjugada à peroxidase (Calbioquem, título de 1/2500), seguido por uma incubação de 1h. Posteriormente, a placa foi lavada mais 3 vezes, e, por fim, 150  $\mu$ L por poço do cromógeno (ácido 5-amino salicílico ou OPD) com peróxido de hidrogênio foram adicionados. Após 30 minutos de incubação, a temperatura ambiente e na ausência de luz, a reação foi parada com 100 $\mu$ L por poço de ácido sulfúrico 1M. Por fim, a leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

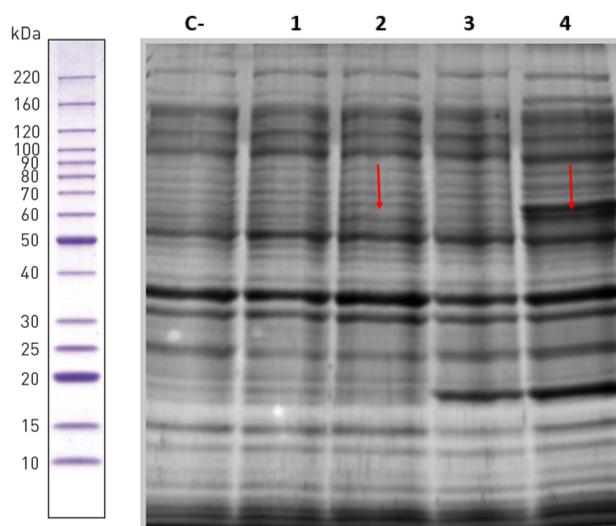
Para essa análise, foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivos, negativos e o coeficiente Kappa. As análises estatísticas foram calculadas utilizando a tabela de contingência 2 a 2 com IC binomial exato de 95%, usando o Software OpenEpi (Versão 2.3.1, Centros de Controle de Doenças, Atlanta, GA, EUA). Além disso, também foi mensurada a precisão global dos testes por meio da área sob a curva ROC (AUC) de acordo com Swets (1988). Os gráficos foram gerados pela versão 8.02 do GraphPad Prism (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750 UTILIZANDO DUAS LINHAGENS DE *E. COLI*

Os experimentos para avaliar o melhor sistema de expressão para a proteína 0750 foram realizados com as seguintes linhagens: BL21 Star™ (DE3) e BL21 (DE3) pLysS, previamente transformadas com o vetor pET21a. Além disso, foi utilizado como controle da indução o pEt21a Ø (vazio), ou seja, o plasmídeo fechado sem o gene da proteína recombinante. Para avaliar o melhor sistema de expressão foram coletadas frações da cultura antes e após a adição do IPTG. Quando a expressão foi realizada utilizando a linhagem BL21 Star™ (DE3), foram observados baixos níveis de expressão da proteína de interesse (Frações 1 e 2 da figura 7). Por outro lado, foram expressas maiores quantidades da proteína 0750 utilizando a linhagem BL21 (DE3) pLysS (Frações 3 e 4 da figura 7). A separação das frações por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) possibilitaram visualizar que a obtenção proteína Lbrm0750 de aproximadamente 64 kDa foi realizada com sucesso, conforme representada na fração 4 da figura 7 (referente ao pós-IPTG).

**Figura 7:** Avaliação da expressão da proteína 0750 utilizando diferentes linhagens de *E. coli*.



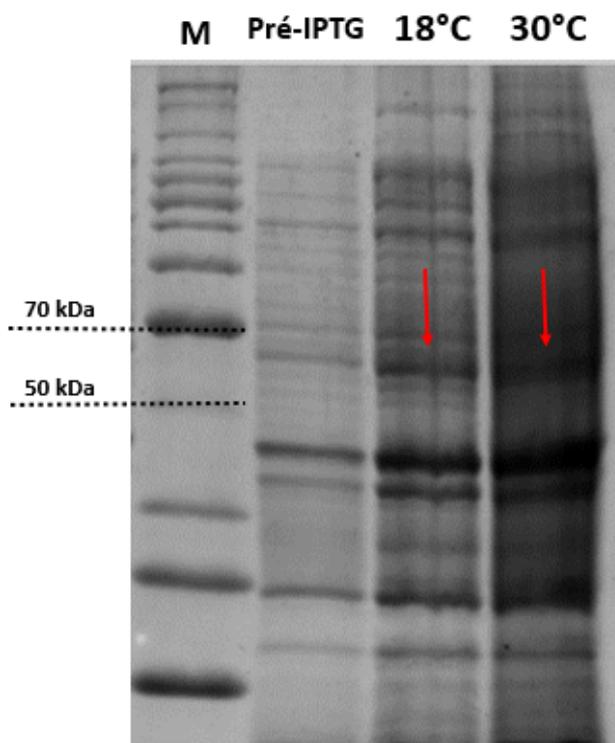
**Fonte:** A autora (2023)

**Nota:** Fracionamento em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da proteína 0750. C-: pET21a Ø (vazio), ou seja, o plasmídeo fechado, sem o gene da proteína recombinante 0750. As setas indicam a expressão da proteína 0750. Frações 1 e 2: Pré/Pós-IPTG com a linhagem BL21 Star™ (DE3). Frações 3 e 4 Pré/Pós-IPTG com a BL21 (DE3) pLysS.

## 5.2 OTIMIZAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750

Para avaliar a influência da temperatura de cultivo na expressão da proteína 0750, foram realizados ensaios com as seguintes temperaturas: 18°C e 30°C, utilizando a frequência de agitação de 180rpm e 0,5M de IPTG. Com essa análise foi possível observar que a proteína foi expressa nas duas temperaturas avaliadas. Entretanto, maior expressão proteica foi obtida, quando a indução foi realizada na temperatura de 30°C. O perfil de expressão da proteína recombinante 0750 nas diferentes temperaturas avaliadas está representado na figura 8.

**Figura 8:** Teste de diferentes temperaturas de indução da proteína 0750.



**Fonte:** Autora (2023)

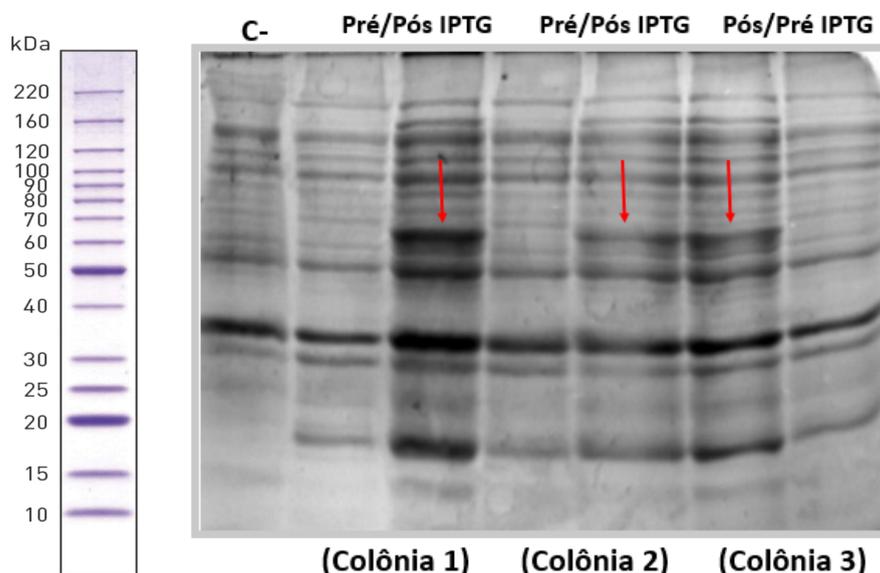
**Nota:** A fração (M) refere-se ao marcador de peso molecular. As setas indicam a expressão da proteína 0750 nas diferentes temperaturas avaliadas.

## 5.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750

Após selecionar as melhores condições para expressão da proteína do estudo, três diferentes colônias transformadas com a linhagem BL21 (DE3) pLysS foram cultivadas, a fim de observar qual demonstrava a melhor expressão da proteína recombinante. A colônia bacteriana pode apresentar crescimento diferente, por esse

motivo diferentes colônias foram cultivadas. A escolha das colônias que seriam induzidas foi realizada com base em suas características macroscópicas. Após selecionar três diferentes colônias foi realizado o cultivo, separadamente, em meio LB, com temperatura de indução de 30°C, e agitação de 180rpm. Ao final, foram coletadas alíquotas dos extratos proteicos das diferentes culturas bacteriana e essas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A figura 9 indica que houve indução da proteína em todas as colônias, entretanto, uma maior quantidade da proteína foi obtida com a colônia 1, sendo essa a colônia utilizada nas etapas posteriores.

**Figura 9:** Indução da proteína recombinante 0750.



**Fonte:** A autora (2023)

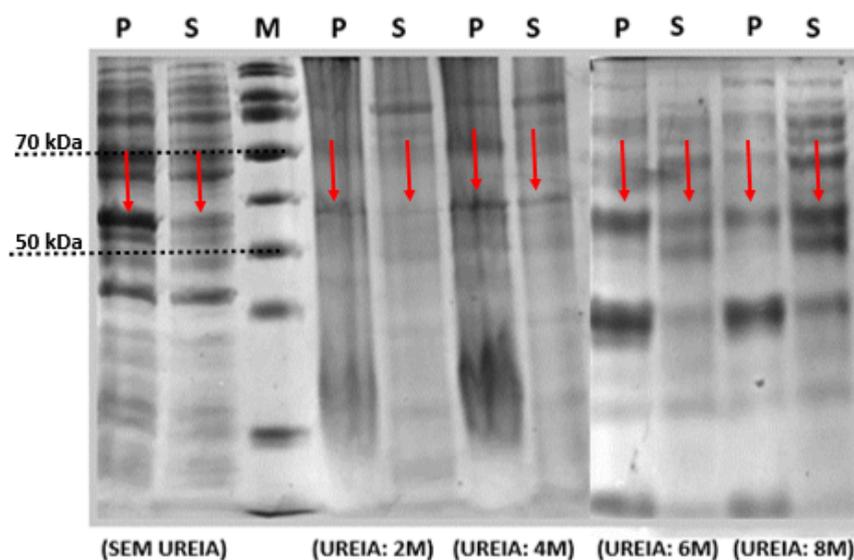
**Nota:** Fracionamento em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da midi indução da proteína 0750. O gel mostra como controle negativo (C-) o vetor de expressão pET21a Ø (vazio), ou seja, o plasmídeo fechado, sem nenhum gene da proteína. Na sequência, o pré e pós IPTG de cada uma das colônias. As setas indicam a expressão da proteína 0750 nas diferentes colônias.

#### 5.4 TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750

Visando uma melhor purificação da proteína 0750, foi realizado o teste de solubilidade. Esse teste foi conduzido para analisar característica de solubilidade da proteína 0750, assim como qual a concentração ideal de ureia seria necessária para observar maior grau de pureza da proteína (a proteína é considerada solúvel quando se encontra no sobrenadante e insolúvel quando está presente no pellet). Para execução dos testes, foi utilizado o tampão de lise e equilíbrio (20 mM fosfato

de sódio, 300 mM Tris, 5 mM de imidazol – pH 8,0). O tampão foi preparado de quatro formas, variando a concentração de ureia nas seguintes condições: 2M, 4M, 6M e 8M. Além disso, também foi produzido o tampão sem ureia para avaliar o comportamento da proteína nessa condição. Dessa forma, cinco padrões de expressão da proteína foram analisados. Após a separação do pellet e sobrenadantes por centrifugação, os tampões com cada uma das concentrações de ureia foram adicionadas às frações. O teste de solubilidade indicou que a 0750 é uma proteína solúvel, visto que foi identificada sua presença na fração referente ao sobrenadante. Ao avaliar a melhor concentração de ureia a ser utilizada, observou-se a presença da proteína em todas as frações avaliadas com as diferentes concentrações de ureia, entretanto, a expressão foi mais eficiente na concentração de 8M devido a maior quantidade de proteína presente na fração relacionada ao sobrenadante. Os testes com as diferentes concentrações de ureia podem ser observados na figura 10, representando a proteína 0750 com aproximadamente 64 kDa.

**Figura 10:** Teste de solubilidade da proteína 0750

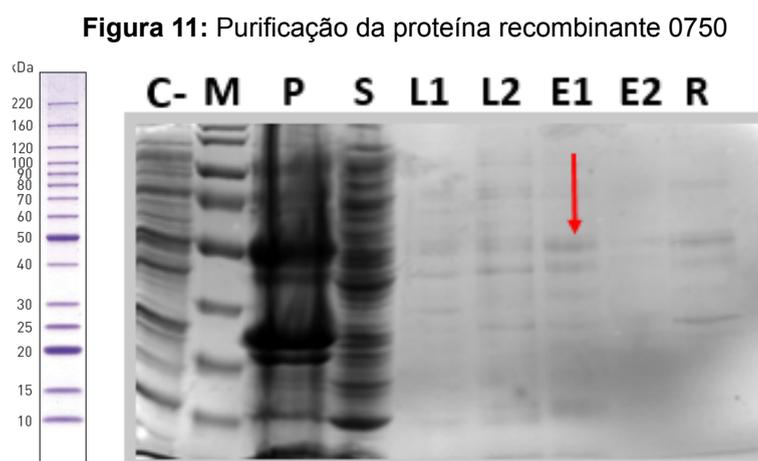


**Fonte:** Autora (2023)

**Nota:** Avaliação da solubilidade e condições de melhor expressão da proteína recombinante 0750 utilizando tampões sem ureia e com diferentes concentrações de ureia. (P) indica a fração do pellet (insolúvel). (S) indica a fração com sobrenadante (solúvel). As setas indicam a expressão da proteína 0750 nas diferentes condições de ureia.

### 5.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750

Após a otimização do protocolo de obtenção da proteína recombinante, a purificação foi realizada. Todas as frações obtidas no processo de purificação mediante a utilização de diferentes tampões descritos na metodologia, o material foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Ao final, foi possível observar a proteína com maior grau de pureza presente na fração referente ao processo de eluição (Eluição 1). Sendo assim, os ensaios posteriores na metodologia de ELISA foram realizados utilizando a proteína obtida nessa fração. Por fim, a proteína 0750 obtida foi quantificada segundo protocolo de Bradford apresentando uma quantificação de 13,33ng/ $\mu$ L. A figura 11 demonstra todas as etapas da purificação, e qual fração pode-se observar a proteína com o maior grau de pureza (E1), apresentando peso molecular de aproximadamente 64 kDa.



**Fonte:** Autora (2023)

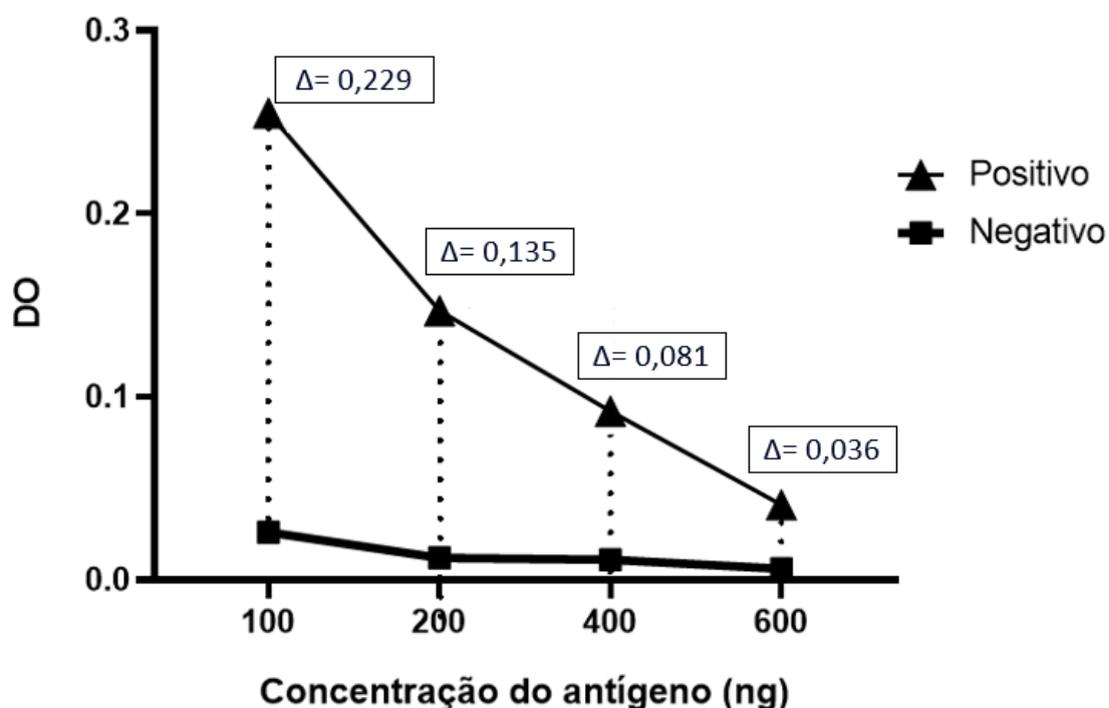
**Nota:** Fracionamento em gel SDS-PAGE. O gel mostra como controle negativo (C-) o vetor de expressão pET21a  $\emptyset$  (vazio), sem o gene da proteína 0750. (M) representa o marcador de peso molecular. (P) indica o pellet. A fração sobrenadante (S) indica a fração de proteínas que não se ligou a resina. L1 e L2 significam lavagens 1 e 2. E1 e E2 significam eluições 1 e 2, com seta representando a fração escolhida. R significa resina.

### 5.6 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DE LT UTILIZANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750

Visando otimizar as condições ideais para o teste de ELISA utilizando como antígeno a proteína recombinante 0750, diferentes etapas foram realizadas. Inicialmente, visando determinar a concentração em nanograma da proteína recombinante para os ensaios, foram testadas quatro diferentes concentrações:

100ng, 200ng, 400ng e 600ng, utilizando amostras sabidamente positivas e negativas para LT. Como controle interno da reação, foi aplicada um antígeno já conhecido e utilizado nos ELISAs indiretos convencionais, o extrato bruto de proteínas da *L (V.) braziliensis*. Os resultados obtidos foram expressos a partir da densidade óptica (DO) apresentada por cada amostra positiva e negativa. Para avaliar a melhor concentração a ser utilizadas nos ensaios, foi realizado um cálculo da variação ( $\Delta$ ) da DO. Avaliando os diferentes valores obtidos da DO foi definido como concentração de escolha a que apresentou o maior delta. Dentre as concentrações testadas com a proteína 0750, a de 100ng foi a concentração de escolha por apresentar maior variação de DO ( $\Delta = 0,229$ ), conforme representado na figura 12.

**Figura 12:** Padronização da concentração em nanogramas da proteína recombinante Lbrm0750

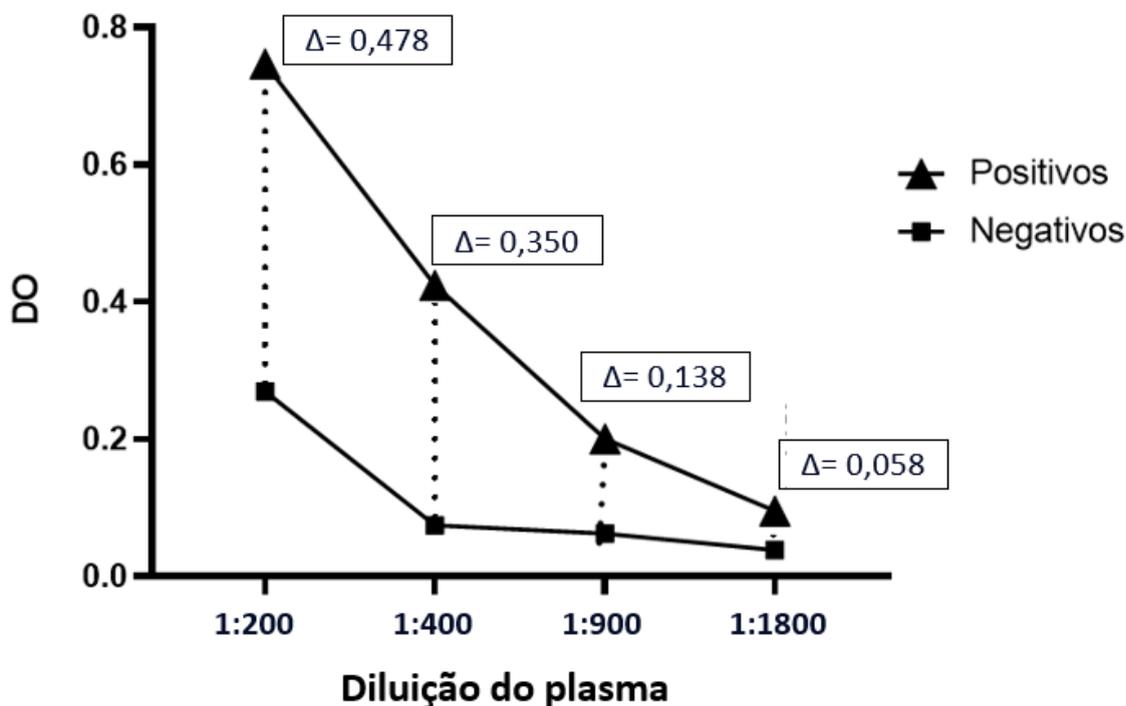


Fonte: Autora (2023).

Em seguida, as otimizações continuaram, e um novo ensaio foi realizado para determinar a melhor diluição das amostras de plasma a serem utilizadas. Para essa etapa, foi utilizada a proteína 0750 na concentração previamente padronizada (100ng), e essa foi testada com amostras sabidamente positivas e negativas para LT nas seguintes diluições: 1:200, 1:400, 1:900 e 1:1800. Os resultados dessa análise foram expressos a partir da densidade óptica (DO) apresentada por cada amostra. Dentre as diluições testadas, a diluição de 1:200 foi a que apresentou a

maior variação de DO ( $\Delta = 0,478$ ), sendo essa a diluição escolhida para os ensaios posteriores (Figura 13).

**Figura 13:** Padronização da diluição do plasma para a proteína recombinante Lbrm0750



Fonte: Autora (2023).

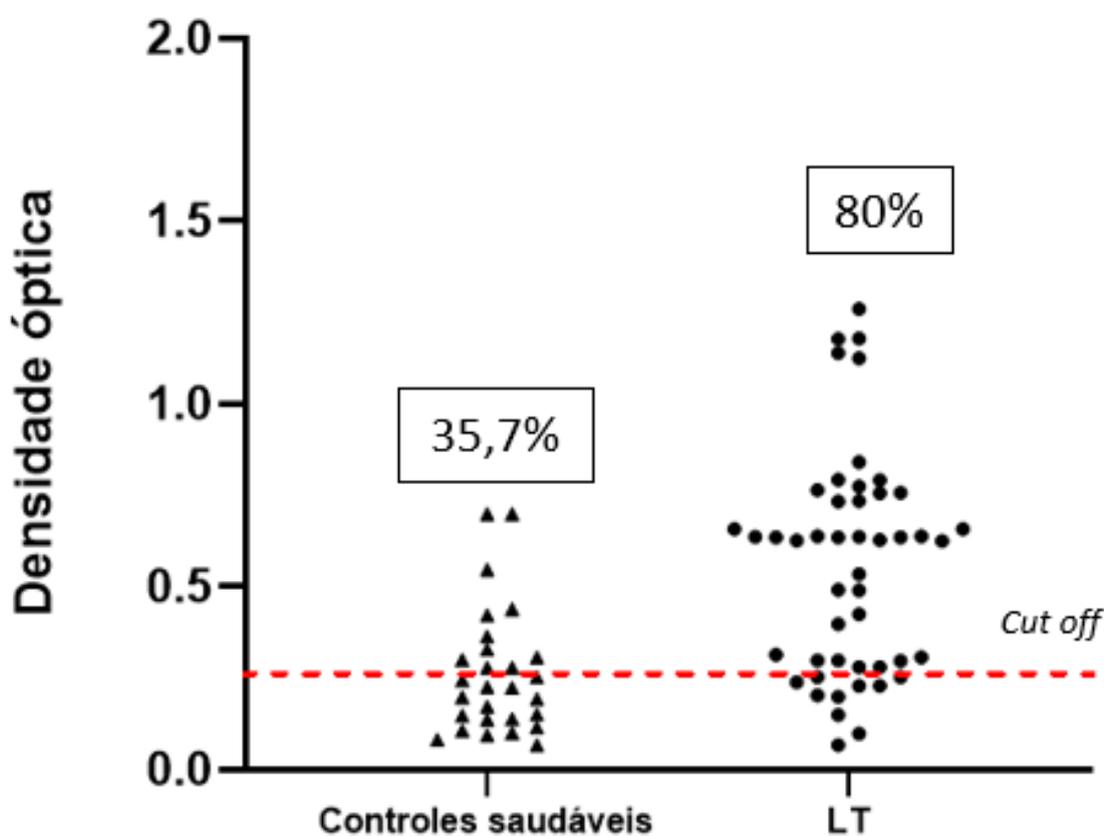
### 5.7 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750 NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT ATRAVÉS DO TESTE DE ELISA.

Após as etapas de padronização, foi avaliada a aplicabilidade da proteína 0750 na identificação de amostras de pacientes portadores de LT ativa, por meio do ensaio de ELISA. Para essa análise, foram utilizadas amostras sabidamente positivas de pacientes portadores de LT ( $n=50$ ), na diluição padronizada de 1:200, e amostras de indivíduos saudáveis, como o grupo controle, na mesma diluição. O limiar de reatividade do ensaio foi calculado considerando os valores de sensibilidade e especificidade.

Para avaliar o resultado do ELISA, foi inicialmente calculado o *cut-off* para o teste a partir da construção da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), com base na reatividade das amostras do grupo controle. O resultado foi expresso a partir da DO das amostras, menos o valor do Branco (Sem adição do antígeno ou plasma), apresentando ao final um valor de 0,2795. Sendo assim,

apenas amostras que apresentaram um valor de DO acima de 0,2795 foram consideradas positivas para o teste. Das amostras avaliadas, 80% (40/50) foram consideradas positivas para LT, como demonstrado na figura 14. Ao avaliar as amostras do grupo controle, houve reconhecimento de 35,7% (10/28) dessas amostras pela proteína 0750.

**Figura 14:** Reatividade das amostras de portadores de LT no teste de ELISA utilizando a proteína 0750



Fonte: Autora (2023).

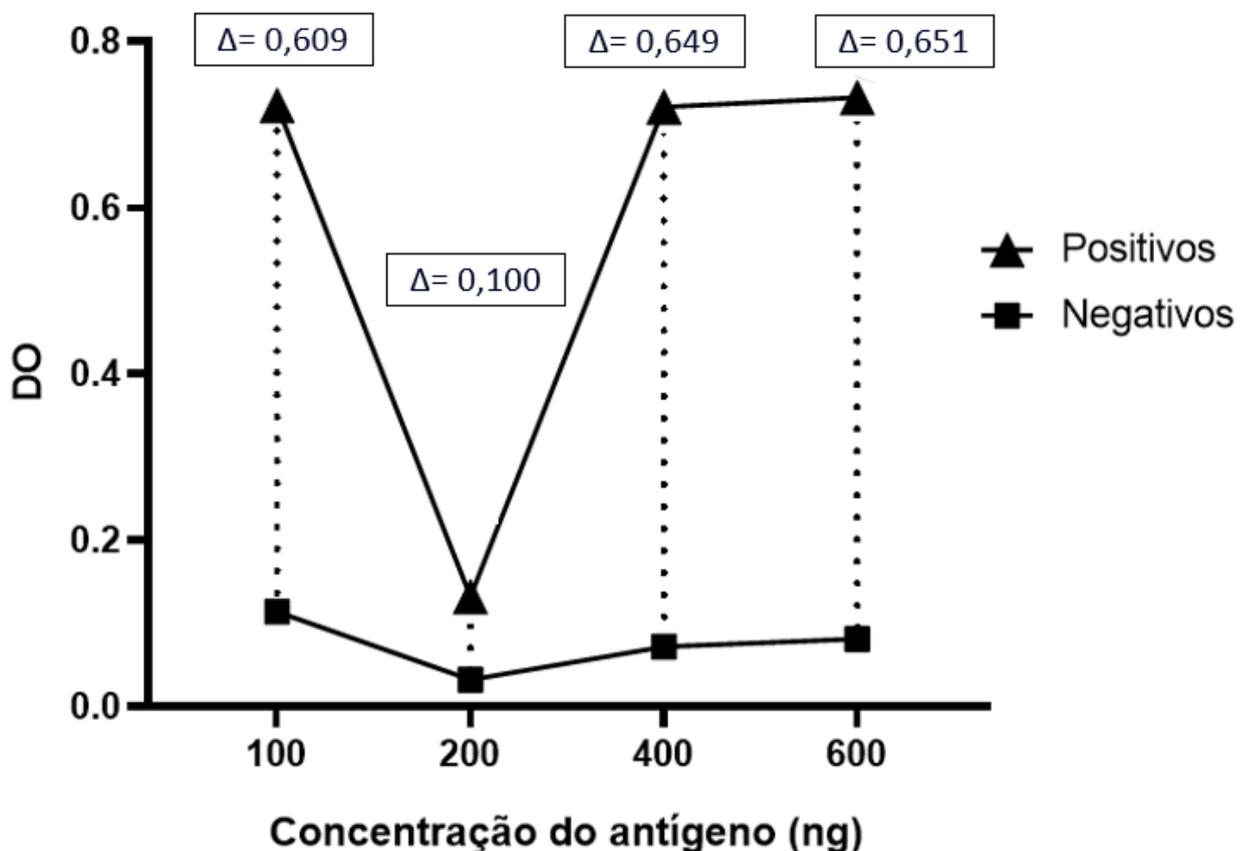
## 5.8 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DE LT UTILIZANDO O EXTRATO BRUTO DE *L. (V.) BRAZILIENSIS*

As etapas de padronização utilizando o extrato bruto da *L. (V.) braziliensis* foram realizadas e analisadas semelhante às etapas descritas anteriormente, utilizando a proteína recombinante 0750.

Sendo assim, a primeira padronização foi realizada para definir a concentração ideal do extrato bruto a ser utilizado nos ensaios de ELISA. Para isso foram testadas as seguintes concentrações: 100ng, 200ng, 400ng e 600ng, utilizando amostras sabidamente positivas e negativas para LT. Os resultados foram

obtidos da mesma maneira já descrita para a proteína recombinante 0750. Dentre as concentrações da proteína testadas com esse antígeno, as concentrações de 400ng e 600ng se destacaram como ideais. Dessa forma, foi escolhida a concentração intermediária de 500ng, visto que já foi uma concentração utilizada em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (PEREIRA, 2021).

**Figura 15:** Padronização da concentração do extrato bruto total de proteínas da *L. (V.) braziliensis*.

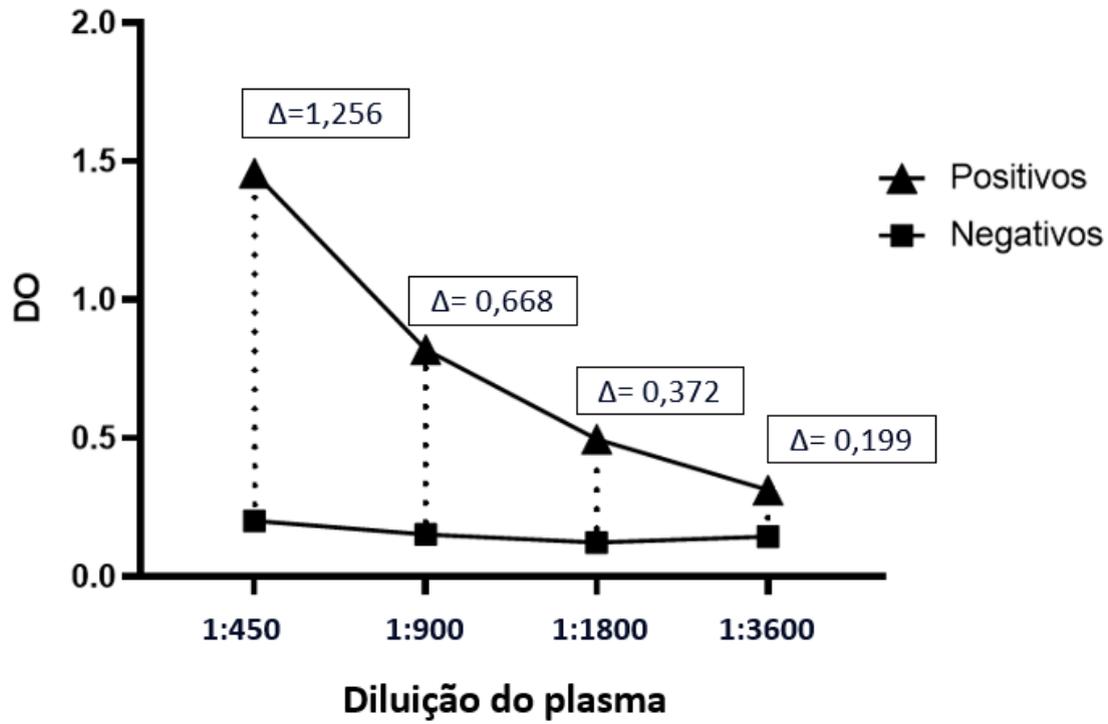


Fonte: Autora (2023).

Nota: DO significa a densidade óptica. O símbolo  $\Delta$  representa a variação.

Em seguida, as otimizações continuaram, e um novo ensaio foi realizado para a valer a melhor diluição do plasma. Para essa etapa, foram testadas amostras positivas e negativas para LT utilizando diluições previamente conhecidas: 1:450, 1:900, 1:1800 e 1:3600. Os resultados para essa análise também foram expressos a partir da densidade óptica (DO) apresentada por cada amostra. Dentre as diluições testadas, a diluição de 1:450 foi a que apresentou a maior variação de DO ( $\Delta = 1,256$ ), sendo essa a diluição escolhida para os ensaios posteriores.

**Figura 16:** Padronização da diluição do plasma para o extrato bruto total de proteínas da *L. (V.) braziliensis*



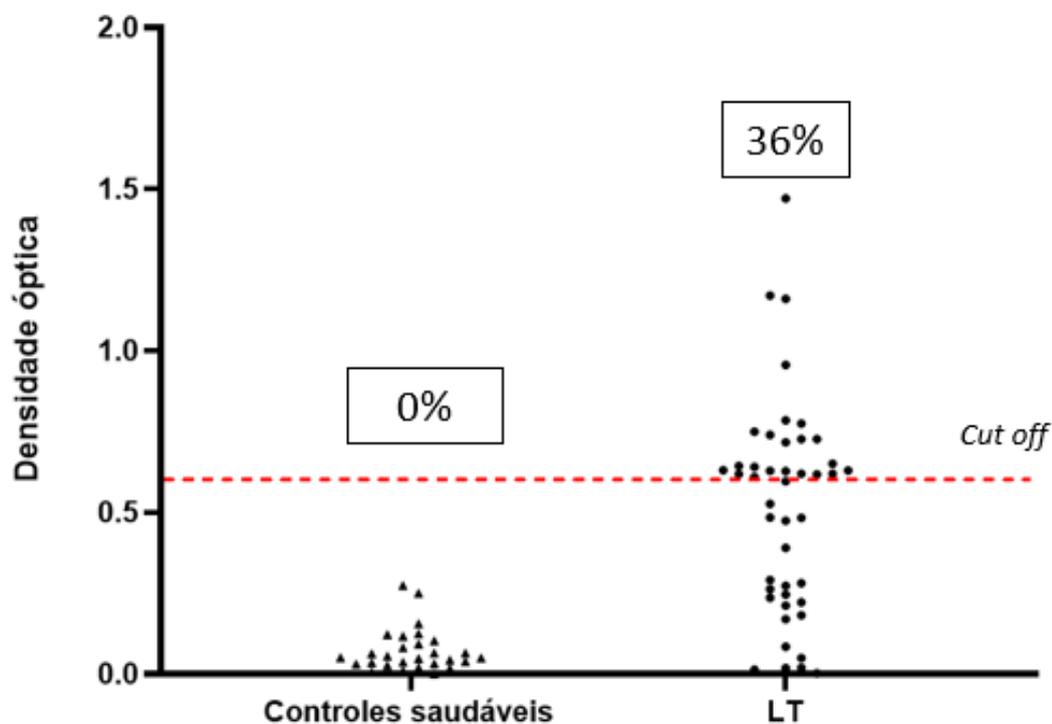
Fonte: A autora (2023)

### 5.9 AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *L. (V.) BRAZILIENSIS* NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT ATRAVÉS DO TESTE DE ELISA

Após as etapas de padronização, o desempenho do teste de ELISA, utilizando o extrato bruto de *L. (V.) braziliensis*, foi avaliado. Para esse ensaio foram utilizadas 50 amostras (as mesmas amostras utilizadas no ensaio de ELISA com a proteína recombinante 0750) de pacientes positivas para LT diluídas na concentração padronizada de 1:450. A sensibilização ocorreu com o extrato bruto de *L. (V.) braziliensis* na concentração de 500ng. O cálculo do limiar de reatividade do ensaio foi realizado a partir das amostras negativas. O resultado foi expresso a partir da DO das amostras, menos o valor do Branco (Sem adição do antígeno ou plasma), apresentando ao final um valor de 0,640. Sendo assim, apenas amostras que apresentaram um valor de DO acima de 0,640, foram consideradas positivas para o teste. Com isso, das 50 amostras avaliadas, 36% (18/50) foram consideradas

positivas para LT, segundo o referido teste (FIGURA 17). Ao analisar as amostras do grupo controle, não houve identificação dessas como positivas pelo teste.

**Figura 17:** Resultado do teste de ELISA com o extrato bruto para identificação de pacientes portadores de LT.



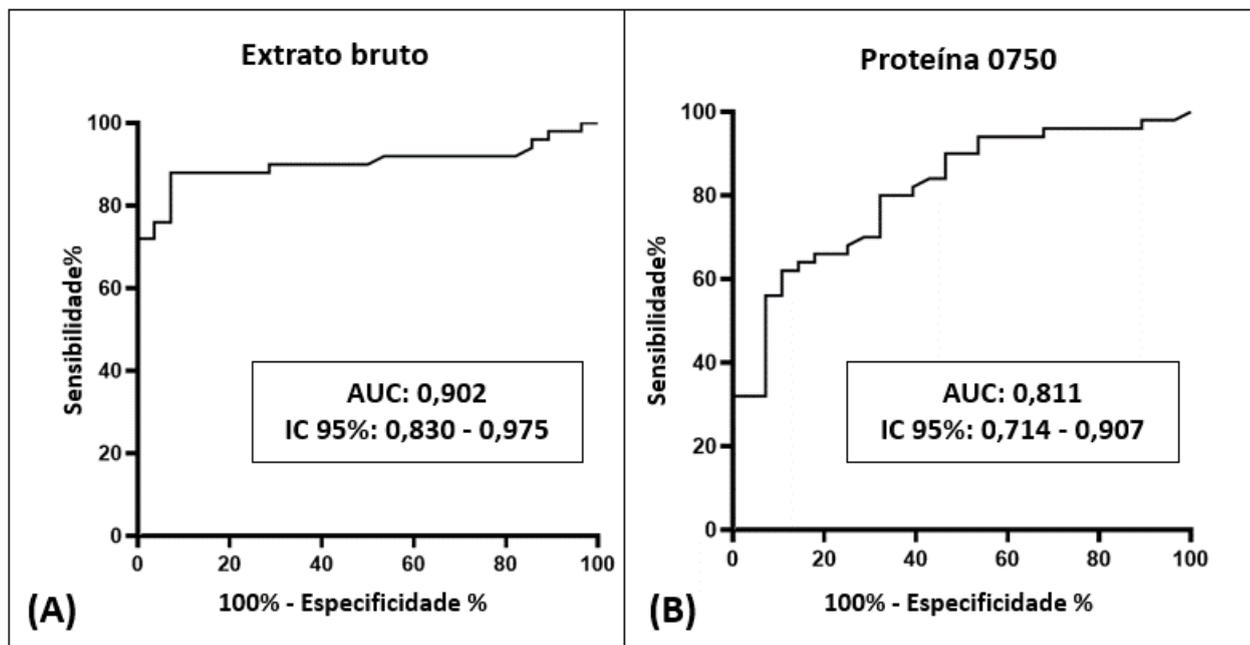
Fonte: Autora (2023)

#### 5.10 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 0750 E O EXTRATO BRUTO DE *L. (V.) BRAZILIENSIS* PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR POR ELISA

No presente trabalho o desempenho do teste de ELISA utilizando a proteína recombinante 0750 foi comparado ao desempenho da técnica convencional, utilizando o extrato bruto do parasito. Ambos antígenos foram avaliados com base em sua capacidade em detectar pacientes com LT ativa.

Para a análise do desempenho de cada antígeno frente às amostras de pacientes portadores de LT e o grupo controle na metodologia de ELISA, foram construídas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Analisando cada curva ROC, observa-se que a área sob a curva (ASC) do ELISA utilizando o extrato bruto (ASC=0,902; IC95%= 0,830-0,975) foi discretamente superior em relação ao desempenho apresentado pela proteína 0750 (ASC=0,811; IC95%=0,714-0,907).

**Figura 20:** Comparação entre as curvas ROC da proteína 0750 e o antígeno bruto de *L. (Viannia) braziliensis*



**Fonte:** Autora (2023).

**Legenda:** A – Curva ROC do teste de ELISA utilizando o extrato bruto da *L. (V.) braziliensis*; B- Curva ROC do teste de ELISA utilizando a proteína recombinante 0750.

Para comparar a performance geral dos antígenos utilizados nesse estudo no ensaio de ELISA, foram realizados cálculos dos parâmetros de sensibilidade e especificidade obtido com cada uma das moléculas. Além disso, foram calculados os valores preditivos positivos (VPP) e valores preditivos negativos (VPN) (TABELA 1). Esses resultados demonstram que a sensibilidade apresentada pela proteína 0750 foi superior a observada com o antígeno bruto. Por outro lado, ao avaliar a especificidade do antígeno bruto, essa foi de 100%, superior à observada com a proteína 0750 que foi 64, 29%. Por fim, foi calculado o índice de Kappa, avaliando a concordância entre os resultados. Para a proteína recombinante 0750, o índice de concordância obtido foi considerado moderado (0.442), em contraste a concordância obtida com o extrato bruto do parasito foi considerada regular (0,287).

**Tabela 1:** Análise de desempenho dos testes de ELISA com a proteína 0750 e o extrato bruto de *L. (V.) braziliensis*

	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>	<b>Kappa</b>
Proteína 0750 <b>(95% IC)</b>	80% (66.96, 88.76)	64.29% (45.83, 79.29)	80% (66.96, 88.76)	64.29% (45.83, 79.29)	0.4429 (0.2209 - 0.6648)
Extrato bruto <b>(95% IC)</b>	36% (24.14, 49.86)	100% (87.94, 100)	100% (82.41, 100)	46.67% (34.63, 59.11 <sup>1</sup> )	0.2877 (0.1319 - 0.4434)

**Fonte:** Autora (2023)

**Nota:** (IC): Intervalo de confiança, (VPP): Valores preditivos positivos e (VPN): Valores preditivos negativos.

## 6 DISCUSSÃO

A Leishmaniose Tegumentar continua sendo considerada um grave problema de saúde pública. Para o diagnóstico não existe uma técnica considerada padrão ouro (DE BRITO *et al.*, 2020). As principais alternativas são baseadas em ensaios sorológicos, como a IFI e o ELISA, entretanto, essas técnicas podem apresentar limitações. Uma das principais dificuldades encontra-se relacionada ao tipo de antígeno utilizado, que pode influenciar diretamente nos parâmetros de sensibilidade e especificidade (DE SOUZA *et al.*, 2019). Segundo Noya *et al.* (2003), para que um teste de diagnóstico sorológico apresente um bom desempenho, a escolha de um bom antígeno é essencial.

Uma das abordagens sorológicas mais utilizadas na rotina laboratorial é o ensaio de ELISA. Esse teste possibilita a aplicação de diferentes moléculas como antígenos, podendo ser o extrato bruto de *Leishmania* ou proteínas recombinantes (MIRÓ *et al.*, 2008). O ELISA convencional indireto para LT, utilizando o extrato bruto de proteínas do parasito como antígeno, apresenta considerável desempenho, entretanto os resultados são heterogêneos (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; PEDRAL-SAMPAIO *et al.*, 2016). Além disso, reações cruzadas com outros tripanosomatídeos são observadas com frequência (DE BRITO *et al.*, 2020; DE VRIES *et al.*, 2022).

Visando o aperfeiçoamento do teste de ELISA, diversos trabalhos vêm focando na produção de antígenos recombinantes (CELESTE *et al.*, 2004; ABASS, *et al.*, 2013; DE SOUZA, *et al.* 2019; DIAS *et al.*, 2018; GALVANI *et al.*, 2021). No cenário da LT, Sato *et al.* (2017) geraram uma promissa proteína recombinante (rLb6H) de *L. (V.) braziliensis* que aplicada no ensaio de ELISA, apresentou sensibilidade (100%) e especificidade (98%). Resultados promissores também foram obtidos por Souza (2013) utilizando como antígeno a proteína recombinante rHSP70, apresentando sensibilidade superior a 80%. Além do direcionamento para o diagnóstico, a identificação de potenciais epítomos através de ferramentas de bioinformática vem sendo utilizada com outros objetivos, como desenho de vacinas (OLIVEIRA *et al.*, 2021) e imunoterapias (BECK *et al.*, 2007).

Na perspectiva de aperfeiçoar o ensaio de ELISA, o presente trabalho propôs a utilização de uma promissa proteína recombinante. A proteína recombinante foi obtida em um trabalho anterior do grupo (TAVARES, 2017) mediante a aplicação de ferramentas de bioinformática para análise do proteoma predito da *L. (V.)*

*braziliensis*. Essa análise possibilitou a identificação de epítomos imunogênicos e específicos para células B e posterior construção da proteína recombinante Lbrm0750 que foi expressa em *Escherichia coli*.

A *E. coli* é um dos sistemas de expressão mais utilizado na obtenção de proteínas recombinantes, por apresentar vantagens como: ser de fácil manipulação, baixo custo referente ao seu crescimento e facilidade de produção de proteína em larga escala (CUI et al., 2016; ZHANG et al., 2022). Entretanto, diferentes fatores podem influenciar no processo de expressão heteróloga. Além de características relacionadas diretamente ao modelo de expressão utilizado, outros parâmetros, como a composição do meio de cultivo, taxa de crescimento específico no instante de indução, tipo de molécula indutora, e a temperatura de cultivo, podem influenciar no rendimento final da proteína (POPOV et al., 2011; SAWERS; JARSCH, 1996). Dessa maneira, observa-se a necessidade de avaliar as condições ideais para que a proteína seja altamente expressa (PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014), uma vez que o propósito principal da expressão de proteínas recombinantes é ao final conseguir um alto rendimento do produto (PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014; SORENSEN, MORTENSEN, 2005),

Visando uma melhor obtenção da proteína 0750 para ser avaliada no ensaio de ELISA, parâmetros relacionados ao melhor sistema de expressão a ser utilizado, temperatura ideal e características relacionadas a solubilidade foram previamente avaliados. Primeiramente, para indicar o melhor sistema de expressão, duas linhagens de *E. coli* foram testadas, a linhagem BL21 Star™ (DE3) e BL21 (DE3) pLysS. A realização desse teste é de extrema importância, uma vez que nem todo sistema de expressão irá garantir um alto rendimento proteico (ZHANG et al., 2022).

No presente estudo, embora tenha sido observado a expressão da proteína recombinante 0750 em ambas linhagens, uma maior quantidade de proteína foi expressa ao utilizar a linhagem BL21 (DE3) pLysS. A designação DE3 significa que as cepas possuem uma cópia cromossômica do gene RNA polimerase 7 sob o controle do promotor *lacUV5* (JHEONG et al., 2005; JHEONG et al., 2009). Essa presença possibilita a expressão proteica mediante a adição do indutor que atua como análogo da lactose, o isopropil- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Entretanto, pode ser observado com frequência uma expressão proteica em nível basal na linhagem BL21 Star™ (DE3), o que pode resultar em toxicidade à proteína (GOPAL; KUMAR, 2013). Por outro lado, a linhagem BL21 (DE3) pLysS controla

melhor a expressão basal devido à presença da lizosima, que atua degradando a polimerase T7 basal, reduzindo sua expressão na ausência de um indutor (GOPAL; KUMAR, 2013; ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019). Dessa forma, o maior rendimento da proteína 0750 pode ser atribuído à essas características apresentada pela linhagem. Resultado semelhante apresentando boa expressão de proteína com a BL21 (DE3) pLysS também já foi relatado por Machado, 2016.

Além do tipo de sistema de expressão, a temperatura utilizada durante a expressão o processo é outra importante variável. Ao analisar a influência da temperatura foi observado a expressão da proteína nas duas temperaturas avaliadas, 18 e 30°C. Trabalhos como o de Papanephytou; Kontopidis (2014), já relataram que temperaturas de indução mais elevadas podem afetar a estabilidade plasmidial e conseqüentemente a expressão da proteína. Entretanto, analisando a expressão da proteína 0750, uma melhor expressão proteica foi observada ao testar a temperatura de 30°C, quando comparado a 18°C. Resultado semelhante foi obtido por Ramos (2018), que analisando diferentes temperaturas de indução, observou melhores resultados utilizando temperaturas mais elevadas. Corroborando com esses resultados, Donovan *et al* (1996), descrevem que temperaturas até 30°C viabilizam a expressão de proteínas solúveis. Uma possível explicação, está relacionada com a taxa de crescimento ideal da *E. coli*. De acordo com Noor *et al* (2013) a temperatura ótima de crescimento para essa bactéria encontra-se entre 37°C e 39°C, coincidindo com a temperatura em que o promotor *lac* desempenha sua atividade máxima.

O passo seguinte consistiu na avaliação de características relacionadas a solubilidade da proteína. A solubilidade é um parâmetro importante a ser avaliado no momento de expressão (LIDDY *et al.*, 2010). Quanto mais solúvel a proteína, menor a possibilidade de formação de corpúsculos de inclusão (NIIRANEN *et al.*, 2007). A presença desses corpúsculos pode acarretar perda de funcionalidade e dobramento errado da proteína (FISCHER; SUMMER; GOODENOUGH, 1993). No presente estudo, a proteína 0750 apresentou-se como solúvel por ser observada na fração referente ao sobrenadante. Essa característica possibilitou o avanço dos ensaios para a etapa seguinte de purificação, sem a necessidade de avaliar outras condições para a obtenção da proteína, o que ocorreria em uma situação de proteína insolúvel (FERRER-MIRALLES *et al.*, 2014). A etapa de purificação da proteína 0750 foi facilitada pela presença de uma tag de histidina adicionada no

final de sua sequência durante as etapas de estudos *in silico* de sua sequência e síntese. A histidina apresenta afinidade por íons de metais bivalentes, como o níquel (Ni<sup>2+</sup>) presente na resina utilizada no processo de purificação (GE HEALTHCARE, 2010). Dessa forma, durante a interação do lisado bacteriano com a resina, a proteína que apresentar a tag de histidina ficará retida na coluna devido à afinidade com o níquel da resina, enquanto proteínas endógenas da bactéria são lavadas e descartadas mediante a adição de tampões.

Após a otimização do protocolo de obtenção da proteína recombinante, foram realizados os ensaios de ELISA. Esse teste possibilita a aplicação de diferentes molécula como antígenos, podendo ser o extrato bruto de *Leishmania spp.* ou proteínas recombinantes (MIRÓ *et al.*, 2008). O desempenho final do ensaio, sobretudo relacionados a sua sensibilidade e especificidade, dependem do antígeno utilizado (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2014). A etapa de otimização de ambos antígenos para ser utilizados no ensaio de ELISA foi realizada com êxito. Quando avaliada a capacidade de reconhecer amostras de pacientes portadores de LT, a proteína 0750 identificou um número maior de pacientes sabidamente positivos, apresentando melhor sensibilidade, em comparação com a identificação das mesmas amostras utilizando o extrato bruto do parasito. A melhor sensibilidade global, atribuída à proteína 0750, pode ser justificada por seu processo de identificação. TAVARES (2017) efetivou essa etapa por meio da utilização de ferramentas de bioinformática em que foi realizada a análise do proteoma predito da *L. (V.) braziliensis*. Essa análise permitiu a identificação de epítomos imunogênicos e específicos para células B, com potencial para diagnóstico.

A sensibilidade obtida com a proteína 0750 condiz com outros estudos que utilizaram proteínas recombinantes obtidas de *L. (Viannia) braziliensis*, como, por exemplo, a rK108, rLbHyM, rLHHs, rHSPH83, RA2, rLb6H, e a rLb8E (CELESTE., *et al.*, 2004; ABASS, *et al.*, 2013; SATO, *et al.*, 2017; LIMA, *et al.*, 2017; DIAS, *et al.*, 2018; DE SOUZA, *et al.* 2019).

A implementação dessas moléculas na metodologia do ELISA resultou em melhor sensibilidade e especificidade do ensaio, em relação à sensibilidade obtida com o extrato bruto do parasito. Em conjunto, esses resultados corroboram com o estudo realizado por Zanetti *et al* (2019) ao qual é reforçado a melhor sensibilidade do ensaio de ELISA utilizando proteínas recombinantes como antígeno, em

comparação ao ELISA convencional baseado em antígenos solúveis de *Leishmania spp.*

Contudo, ao avaliar a especificidade do ensaio de ELISA, utilizando a proteína 0750, a mesma apresentou limitações nessa questão. Ao analisar amostras de controles saudáveis, a proteína recombinante identificou uma parcela das amostras como falso-positivo. Resultados falso-positivos também já foram observados com a proteína rK39, considerada um marcador de diagnóstico eficaz. Foi avaliado com a rK39 reatividade cruzada com doenças relacionadas à LV, bem como em indivíduos saudáveis residentes em áreas endêmicas de Leishmaniose (SUNDAR *et al.*, 2002). Uma possível justificativa pode estar relacionada com a heterogeneidade observada na resposta imunológica apresentada por cada indivíduo, o que poderia reduzir a eficácia diagnóstica da proteína recombinante. Pereira (2022) utilizando a proteína 0750 no ensaio de ELISA também observou que a proteína não conseguiu diferenciar com eficiência o título dos participantes do grupo controle.

É válido destacar que durante a construção da proteína 0750 a sequência proteica de *L. braziliensis* foi selecionada com base no nível de conservação que apresentavam com as outras espécies de *Leishmania*, o que pode justificar o falso-positivo observado no ensaio de ELISA. Sabe-se que o grupo controle avaliado no presente estudo era sabidamente negativo para a LT, contudo, não se tem conhecimento a respeito de outras possíveis doenças que poderiam ter ocasionado um aumento na quantidade de anticorpos no plasma desses indivíduos. Desse modo, os resultados falso-positivos podem ser provenientes do possível excesso de anticorpos que poderiam facilmente se ligar de maneira cruzada. Outra possível explicação para os resultados falso-positivos obtidos com a proteína 0750 pode estar relacionado ao processo de purificação, visto que embora tenha sido obtido um certo grau de pureza nessa etapa, foi possível observar resquícios de proteína endógena da bactéria *E. coli* o que pode ter interagido com as amostras do grupo controle durante o ensaio de ELISA. Uma possível alternativa para contornar essa limitação seria a realização do processo de purificação da proteína recombinante de forma automatizada. Dessa maneira, seria obtido um melhor rendimento da proteína em sua forma mais pura, descartando a interferência de resquícios de proteínas endógenas da *E. coli*.

Diante dos resultados obtidos, cada antígeno aqui avaliado se destacou em um ponto analisado para o diagnóstico da LT, sensibilidade e especificidade. É

importante pontuar a maior sensibilidade obtida com a proteína 0750. A avaliação da curva ROC construída para essa proteína, embora não tenha sido superior ao observado com extrato bruto do parasito, o desempenho apresentado pode ser classificado como excelente. Esse resultado complementa os estudos realizados por Tavares (2017) que, conforme já descrito, identificou epítomos imunogênicos e específicos para células B, apresentando potencial para o diagnóstico da LT.

Dessa forma, observa-se que são necessários mais estudos com a proteína 0750, sobretudo em relação a sua interação com amostras do grupo controle. Contudo, a aplicação dessa proteína específica de *Leishmania (V.) braziliensis* direcionada ao ensaio de ELISA parece ser uma alternativa promissora para a obtenção de um diagnóstico rápido e eficaz da LT.

## 7 CONCLUSÃO

- a) A otimização do protocolo de obtenção da proteína recombinante Lbrm0750 possibilitou sua purificação e aplicação para o diagnóstico da LT;
- b) A utilização do extrato bruto de *L. (V.) braziliensis* no ensaio de ELISA demonstrou não ser a abordagem mais adequada para o diagnóstico, pois a baixa sensibilidade apresentada na detecção de pacientes portadores de LT ativa;
- c) A utilização do antígeno recombinante 0750 no ensaio de ELISA, demonstrou o aperfeiçoamento da técnica porque foi observada maior sensibilidade, comparando-se com o ELISA utilizando o extrato bruto do parasito.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. **Elsevier Brasil**, 2015.

AKUFFO H ., *et al.* New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, p. 5, 2018.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ANDERSON, C. F. *et al.* IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in nonhealing *Leishmania major* infection. **The Journal of Immunology**, v.183, p.619-4.627, 2009.

ANDRADE, *et al.* New outbreak of American tegumentary leishmaniasis in a military training center in the Zona da Mata region, in the north of the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, 2009.

ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous leishmaniasis: Updates in diagnosis and management. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 101-117, 2019.

ASSOLINI JP *et al.* Nanomedicine in leishmaniasis: A promising tool for diagnosis, treatment and prevention of disease - An update overview. **Eur J Pharmacol**, v.15, 2022

BACELLAR O, *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun**, v. 70 p, 6734-6740, 2002.

BACELLAR O, *et al.* Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, v., p.75-8, 2009.

BANGERT, M, *et al.* Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. **PLoS Negl. Trop. Dis**, v.12, 2018.

BHARATI K. Human genetic polymorphism and Leishmaniasis. **Infect Genet Evol**, v. 98, 2022.

BOGDAN C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 2, p.69, 2012.

BOEHME, C. C.; HAIN, U.; NOVOSEL, A.; EICHENLAUB, S.; FLEISCHMANN, E.; LÖSCHER, T. Congenital visceral leishmaniasis. **Emerg Infect Dis**, v.12, p. 359-360, 2006.

BRANDÃO-FILHO, S. P., *et al.* Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of The Royal Medicine Hygiene**, London, v. 93, p. 488-494, Sep/Oct. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – **Editora do Ministério da Saúde**, 2017.

BRITO, *et al.* Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n.10, p. 2445-2448, 2008.

BURZA S, CROFT, BOELAERT M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, p. 951-970. 2018.

BUXBAUM,; SCOTT, P. Interleukin 10- and Fcγ Receptor-Deficient Mice Resolve *Leishmania mexicana* Lesions. **Infection and Immunity**, v. 73, p.2101-2108. 2005.

CARVALHO *et al.* Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 5. p. 594-6. 2012.

CARVALHO, Livia Mendes. **Estudo comparativo entre diferentes protocolos de imunoquimioterapia como propostas de tratamento da leishmaniose visceral utilizando o hamster *Mesocricetus auratus* como modelo experimental.** [manuscrito]. Ouro preto - MG, /p.123 - 2021.

CARVALHO AM, BACELLAR O, Carvalho EM. Protection and Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. **Pathogens**, v. 11 p. 466. 2022.

CASTRO, Maria Carolina Accioly Brelaz de *et al.* Chemokine receptors on human regulatory T cells during cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 45, n. 3, 30 jan. 2023.

CAVALCANTE, M. K., PEREIRA, V. R., & ACCIOLY, M. C. Opinion Article: NK Cells in Cutaneous Leishmaniasis: Protection or Damage? **Frontiers in Immunology**, v.13, 2022.

CHEN, J. *et al.* Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino acids*, v. 33, n. 3, p. 423-428, 2007.

CONDE, L., *et al.* Humoral response in Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.12, 2022.

Control of Neglected Tropical Diseases. World Health Organization. Geneva: WHO; 2020. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/#](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/#). Accessed 28 Jan 2023.

COSTA, D. L. *et al.* Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. **Human Immunology**, v. 74, n. 12, p. 1491–1500, 2013.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

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

DAYAKAR, A *et al.* Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v, 10, 2019.

DE ARAÚJO, *et al.* Definition of the main vector of cutaneous leishmaniasis: Ecology and mapping in endemic area of Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 233, 2022.

DE BRITO, Rory Cristiane Fortes *et al.* Recent advances and new strategies Leishmaniasis diagnosis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-12, 2020.

DE LUCA; MACEDO, Amanda Beatriz Barreto. Cutaneous leishmaniasis vaccination: a matter of quality. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 151, 2016.

DE OLIVEIRA, *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. 1-2, p. 245-253, 2013.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & bioscience**, v. 5, n. 1, p. 31, 2015.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*, v.27, p.305–318, 2004.

DE SOUZA, *et al.* Production of a kinesin-related recombinant protein (Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. **One Health**, v. 8, p. 100111, 2019.

DE SOUZA CARMO, E. V., Katz, S. & Barbieri, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PLoS ONE** v. 5, p.13815, 2010.

DE VRIES, H. J. C.; SCHALLING, H. D. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 26, p. 823–840, 2022.

DIRO, *et al.* Use of pentamidine as secondary prophylaxis to prevent visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients, the first twelve months of a prospective cohort study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004087, 2015.

DIVENUTO *et al.* Role of Treg, Breg and other cytokine sets in host protection and immunopathology during human leishmaniasis: Are they potential valuable markers in clinical settings and vaccine evaluation? **Acta Trop**, v. 240, p. 106, 2023.

DONOVAN, R. S.; ROBINSON, C. W.; GLICK, B. R. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. **Journal of industrial microbiology**, v.16, p.145-154, 1996.

DOS SANTOS M, GEDAMU C. Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. **Microorganisms**, v.7, p.695, 2019.

DUBIE T, MOHAMMED Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. **J Immunol Res**. 2020

EL-MANZALAWY, Y.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. **Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal**, v. 21, n. 4, p. 243-255, 2008.

ENGVALL, Eva; PERLMANN, Peter. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, set. 1971.

EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, 2012.

FALCI; PASQUALOTTO. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and biomedical research**. Porto Alegre. Vol. 35, n. 2, p. 65-82, 2015.

FAGUNDES-SILVA, *et al*. Decrease in anti-Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. **Parasite immunology**, v. 34, n. 10, p. 486-491, 2012.

FERRER-MIRALLES, Neus; SACCARDO, Paolo; CORCHERO, José Luis; XU, Zhikun; GARCÍA-FRUITÓS, Elena. General Introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 1-24, 16 nov. 2014.

FISCHER, B.; SUMMER, I.; GOODENOUGH, P. Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli as inclusion bodies. **Biotechnology and Bioengineering**, 41: 3-13, 1993.

FORATTINI, O. P. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. In: **Entomologia Médica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1973. v. 4, p. 658

FRANÇA-COSTA J, *et al* Exposure of phosphatidylserine on Leishmania amazonensis isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PLoS One**, v. 7, 2012.

FREIRE, M. L, *et al*. Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis**. v.13, 2018.

GADELHA *et al.* Ensaio clínico randomizado aberto comparando a segurança e a eficácia de uma, duas ou três doses semanais de isetionato de pentamidina (sete miligramas por quilograma) no tratamento da leishmaniose cutânea na Amazônia. **PLoS Negl Trop Dis**. 2018;12(10):e0006850.

GALVANI NC, et al. ChimLeish, a New Recombinant Chimeric Protein Evaluated as a Diagnostic and Prognostic Marker for Visceral Leishmaniasis and Human Immunodeficiency Virus Coinfection. **Parasitol Res**. (2021) v.120, p.4037–4047, 2021.

GALLUZZI, Luca; CECCARELLI, Marcello; DIOTALLEVI, Aurora; MENOTTA, Michele; MAGNANI, Mauro. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, 2018.

GARCIA *et al.* Development of a chimeric protein based on a proteomic approach for the serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 6805–6817, 2021.

GE HEALTHCARE. Strategies for Protein Purification: Handbook. **Uppsala Sweden: General Electric Company**, 2010.

GOMES, M. L. *et al.* Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 60, p. 205-210, 1999.

GOMES, C. M. *et al.* Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary Leishmaniasis. **Am. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 5, p. 701-709, 2014.

GOPAL, G.J, KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **Protein J**, v.32, p. 419–425, 2013.

GONÇALVES, R., CHRISTENSEN, S. M., & MOSSER, D. M. Humoral immunity in leishmaniasis – Prevention or promotion of parasite growth? **Cytokine: X**, v. 2, 2020.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

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

GUIMARÃES LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, *et al* Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.103, p.712-715, 2009.

HODIAMONT CJ, et al. (2014) Species-Directed Therapy for Leishmaniasis in Returning Travellers: A Comprehensive Guide. **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, 2014.

HURRELL B.P., REGLI I.B., TACCHINI-Cottier F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends Parasitol**, v.32, p. 392–40, 2016.

JEONG, H.; BARBE, V.; LEE, C. H.; et al. Genome Sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3). **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 4, p. 644–652, 2009.

JEONG, H.; KIM, J.; LEE, J. Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, p. 1, 2015.

KIMA PE, *et al.* Internalization of Leishmania mexicana complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**, v.191, p.1063-8, 2000.

LARSEN, J.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome research**, v. 2, n. 1, p. 2, 2006.

LAUFS *et al.* Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 826 - 835, 2002.

LEMOS, Elenice Moreira; CARVALHO, Silvio F. Guimarães; DIETZE, Ralph Corey And Reynaldo. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 36-38, 2003.

LÉVÊQUE, MF, *et al.* Place of Serology in the Diagnosis of Zoonotic Leishmaniasis With a Focus on Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum*. **Fronteiras em Microbiologia Celular e Infeciosa**, v. 10, 2020.

LOCKSLEY, R. M. *et al.* Induction of Th1 and Th2 CD4+ subsets during murine *Leishmania major* infection. **Research in Immunology**, v.142, p.28-32, 1991

MACHADO, Laís Ceschini. **Clonagem e expressão da transposase de mos1 em diferentes cepas de Escherichia coli BL21 (DE3)**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul, 2016.

MARTIN-GAYO; YU XG. Role of dendritic cells in natural immune control of HIV-1 infection. **Front Immunol**. v.10, 2019.

MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES. Detecção de DNA de *Leishmania braziliensis* em pacientes de leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 571-574, 2010.

MARZOCHI MCA, MARZOCHI KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Pública**. v. 10, p.359—75, 1994.

MEDEIROS AR, SILVA WA Jr, ROSELINO AM. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in American tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. **Clinics (Sao Paulo)**, v.63, p.451-456, 2008.

MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Epitope Mapping of the HSP83.1 Protein of *Leishmania braziliensis* Discloses Novel Targets for Immunodiagnosis of Tegumentary and

Visceral Clinical Forms of Leishmaniasis. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 21, n. 7, p. 949-959, 2014.

MENEZES-SOUZA, et al. Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99216, 2014.

MICHALICK MSM, GERANO O. Leishmaniose visceral americana. In: Neves D, de Melo A, Linardi P, Vitor R. **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu;2005. p. 67- 83.

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 146, p. 232-246, 2019.

MOLLINEDO, F., et al. Selective fusion of azurophilic granules with leishmania-containing phagosomes in human neutrophils. **J. Biol. Chem**, v.285, p. 34528–34536, 2010.

MORADIN N, DESCOTEAUX A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Front Cell Infect Microbiol**. v. 12, p. 121. 2012.

MOUGNEAU, E; et al. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011

NEGRÃO; FERREIRA. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percurso**, v. 6, n. 1, p. 147-168, 2014.

NEVES, J. et al. **Parasitologia Dinâmica**, 3 ed., São Paulo: Atheneu, 2009.

NOOR, R.; ISLAM, Z.; MUNSHI, S. K.; RAHMAN, F. Influence of Temperature on *Escherichia coli* Growth in Different Culture Media. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 7, p. 899-904, 2013.

NOVAIS, Fernanda O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **The journal of immunology**, v. 183, n. 12, p. 8088-8098, 2009.

OLIVEIRA, E, et al. Validation of a direct agglutination test prototype kit for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.107, p.243–247, 2013

OLIVEIRA, W. N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary Leishmaniasis. **Cytokine**, Philadelphia, v. 66, n. 2, p.127–132, 2014.

Organização Pan-Americana da Saúde. **Sistema de Informação Regional de Leishmanioses nas Américas (SisLeish)**. Washington, DC: OPAS; 2022

OUALHA R, BARHOUMI M, MARZOUKI S et al. Infection of human neutrophils with *Leishmania infantum* or *Leishmania major* strains triggers activation and differential cytokines release. **Front Cell Infect Microbiol**, v.9, 2019.

PAPANEOPHYTOU, C.P.; KONTOPIDIS, G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. **Protein Expression and Purification**; v.94: p.22-32. 2014.

PEDRAS, M. J. et al. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, n. 3, p. 477-485, 2003.

PEREIRA. Avaliação de imunoenaios para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar utilizando peptídeos e proteínas preditas *in silico*. 149. Dissertação –. **Instituto Aggeu Magalhães**. 2021.

PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v.321, p.970–974, 2008.

PICCICA, M., LAGI, F., BARTOLONI, A., & ZAMMARCHI, L. Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: A systematic review. **Journal of Travel Medicine**, v.28, 2021.

POMARES C, *et al* Western blot analysis as an aid for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.06, p.452-454, 2012.

PRADHAN, S., *et al.* Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.47, p.516-52, 2022.

PISSINATE, et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal immunological methods**, v. 336, n. 2, p. 193-202, 2008.

REIS, L. *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103- 116, 2007.

REITER-OWONA, *et al.* Specific K39 antibody response and its persistence after treatment in patients with imported leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 761-769, 28 out. 2015.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REZENDE, A.M, *et al.* Computational prediction of protein-protein interactions in *Leishmania* predicted proteomes. **PLoS One**, v.7, 2012.

RODRIGUES, E.H.G. Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Dissertação mestrado. **Fundação Oswaldo Cruz**. Pernambuco, Brasil, 2000.

RODRIGUEZ-PINTO, D.; SARAVIA, N. G.; MCMAHON-PRATT, D. CD4 T cell activation by B cells in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. **BMC infect. Dis.**, London, v.14, n. 1, p. 108, 2014.

ROGERS, K. A. *et al.* Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **Fems Microbiology Letters**, v. 209, p. 1-7, 2002.

ROSALES-CHILAMA *et al.*. Parasitological Confirmation and Analysis of *Leishmania* Diversity in Asymptomatic and Subclinical Infection following Resolution of Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, 2015.

ROSANO, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v.28, p, 1412-1422, 2019.

SANDS M, KRON MA, BROWN RB. Pentamidine: a review. **Rev Infect Dis**, v. 7, p.625–34, 1985.

SERRANO-COLL H, *et al.* Innate immune response: ally or enemy in cutaneous leishmaniasis? **Pathog Dis**. v, 79, 2021

SCHWARTZ, J. Pharmaco-and immunotherapeutic strategies for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. 2017.

SCHUBACH, *et al.* Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 987-996, 2001.

SINGH, *et al.* New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 311, 2006.

SIVAKUMAR R. Studies on the kinesin related antigen gene of *Leishmania donovani* and its diagnostic application. **India Institute of Medical Sciences**, New Delhi, India. PhD Thesis 2004.

SOUZA, A. P. *et al.* Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66110, 2013.

STEBUT; TENZER. Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.308, p. 206-214, 2018.

STOCKINGER B, VELDHOEN M. Differentiation and function of Th17 T cells. **Current opinion in immunology**. v, 19. p, 281-286, 2007.

SUNDA K, *et al.* Detecção de teste imunocromatográfico de anticorpo anti-K39 na leishmaniose visceral indiana, **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.96, p.19-23, 2002.

TAVARES, D.H.C. Avaliação da citometria de fluxo no diagnóstico das leishmanioses utilizando antígenos recombinantes. 114. Tese – Instituto Aggeu Magalhães. **Biociências e Biotecnologia em Saúde**, Recife. 2018.

TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 497-507, 2018.

TASLIMI, Yasaman, *et al.* Cutaneous leishmaniasis: multiomics approaches to unravel the role of immune cells checkpoints. **Expert Review Of Proteomics**, [ v. 19, n. 3, p. 213-225, 2022.

TEIXEIRA-CARVALHO, *et al.* FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122938, 2015.

TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.* Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Front Immunol**, v, 9, 2018.

TIBÚRCIO *et al.* . Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View. **Frontiers in Immunology**, v,10, 2019.

TRUJILLO, C. *et al.* The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. **Immunology letters**, v. 70, n. 3, p. 203-209, 2000.

VAN ZANDBERGEN *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **J Immunol Baltim Md**, v, 173, p. 6521–5, 2004.

VAN WEEMEN, B.K; SCHUURS, H. A. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. **Febs Letters**, v. 15, n. 3, p. 232-236, 24 jun. 1971.

VASCONCELOS; ROCHA; DE ARAÚJO. Ocorrência e comportamento sociodemográfico de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Vicência, Pernambuco, no período de 2007 a 2014. **Semana: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 38, n. 1, p. 105-114, 2017.

WHO/PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. No 7. **Department of Neglected Infectious Diseases**, March. 2019.

WIJESOORIYA; SAMARANAYAKE; KARUNAWEERA, N. D. Cytokine and phenotypic cell profiles in human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **PLOS ONE**, v.18, 2023.

YACHI S; *et al.* Leishmaniose cutanée après transplantation rénale : à propos de 7 cas et revue de la littérature [Cutaneous leishmaniasis after renal transplantation: Report of 7 cases and review of the literature]. **Nephrol Ther**, v. 18, p.506-51, 2022.

ZANETTI, *et al.* Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-*Leishmania* antibodies in patients with American Tegumentary Leishmaniasis: a systematic review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 2019.

## ANEXO A

### Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IAM



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS

**Pesquisador:** Valéria Pereira Hernandes

**Área Temática:**

**Versão:** 6

**CAAE:** 11083812.7.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.839.158

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda elaborada para prorrogação e alteração da equipe de pesquisa.

##### Objetivo da Pesquisa:

Prorrogar de cronograma e alterar equipe.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica participante do projeto no hospital onde ela trabalha.

Benefícios:

Avaliar se o participante apresenta algum sinal de infecção ou se é imune a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença.

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br