



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

SABRINA SOARES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM NOVO ANTÍGENO
RECOMBINANTE PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Recife
2023

SABRINA SOARES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM NOVO ANTÍGENO
RECOMBINANTE PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

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.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Wagner José Tenório dos Santos

Recife

2023

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

Silva, Sabrina Soares.

Identificação e avaliação de um novo antígeno recombinante para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar / Sabrina Soares Silva. - Recife, 2023.
63 p. : il., tab.

Orientador(a): Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Coorientador(a): Wagner José Tenório dos Santos
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Proteínas recombinantes. 2. Leishmaniose Tegumentar. 3. Sorodiagnóstico.
4. ELISA. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de . (Orientação). II. Santos, Wagner José Tenório dos . (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

SABRINA SOARES SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM NOVO ANTÍGENO
RECOMBINANTE PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

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. Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE / Departamento de Microbiologia

Dr. Walter Lins Barbosa Junior
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE / Departamento de Parasitologia

Dr. Matheus Filgueira Bezerra
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE / Departamento de Microbiologia

Dedico este trabalho a meus pais, base da minha vida, com todo o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças e abençoado a minha trajetória e guiado meus passos.

Aos meus pais e irmãos pelo amor incondicional e suporte, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, sou imensamente grata por ser parte dessa família.

Ao meu orientador pela atenção, compreensão e confiança durante o projeto.

Ao meu coorientador Wagner pela confiança, suporte e paciência desde o momento da seleção da iniciação científica até hoje.

A minha parceira de bancada e mentora Hemilly, que com seu otimismo e entusiasmo sempre deixa a rotina dos experimentos mais leves e que quando mais precisei me ajudou a seguir a diante com esse trabalho.

Aos meus familiares pelo suporte e orações que sempre acalentam o meu coração.

Aos meus amigos por todos os momentos e risadas compartilhadas, por acreditarem na minha trajetória e me ajudar de tantas formas a confiar no meu potencial.

Aos colegas integrantes do grupo de pesquisa BiomolTrip pelo aprendizado durante período de iniciação científica, o qual foi de suma importância para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores que estimularam meus estudos e vontade de aprendizado, desde o ensino básico até o ensino superior.

E a todos os demais que contribuíram direta e indiretamente para a minha jornada acadêmica meus mais sinceros agradecimentos.

SILVA, S.S. **Identificação E Avaliação De Um Novo Antígeno Recombinante Para O Diagnóstico Sorológico Da Leishmaniose Tegumentar**. 2023. 63. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT), é uma infecção causada por protozoários do gênero *Leishmania sp.*, apresentando ocorrência em todos os estados do Brasil. É considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das mais importantes doenças negligenciadas, afetando aproximadamente 2 milhões de pessoas anualmente. As deformidades causadas pela LT envolvem lesões na mucosa, principalmente as regiões oral e nasofaríngea, podendo ser múltiplas, persistentes e desfigurantes. No entanto, o diagnóstico pode ser difícil devido ao vasto número de doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LT- como, por exemplo, sífilis, hanseníase e tuberculose. Além disso, em áreas endêmicas diferentes espécies causam lesões semelhantes a LT, dificultando o diagnóstico precoce da doença. Os testes sorológicos não possuem eficiência ideal, além de apresentarem reações cruzadas com outros parasitas. Assim, a utilização de proteínas recombinantes tem sido uma alternativa promissora quando utilizada em testes sorológicos, como o ELISA, teste de diagnóstico rápido, demonstrando maior sensibilidade (95-100%) em relação a antígenos solúveis de *Leishmania (V.) braziliensis*. Baseado nesse estudo, buscou-se avaliar o potencial da proteína recombinante Lci9 no diagnóstico da leishmaniose tegumentar. O gene codificador da Lci9 foi subclonado em um vetor de expressão da série pRSET A. A proteína foi produzida em sistema procariótico, e foi efetuada padronização das condições de expressão. Também foi realizado teste de solubilidade com tampões contendo diferentes concentrações de ureia. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade, e avaliada no ELISA, com utilização de 10 soros positivos para leishmaniose tegumentar e 3 soros de indivíduos saudáveis. As melhores condições de expressão da proteína recombinante foram 30°C, 0,5 mM de indutor (IPTG) e 3 horas de indução, sendo significativo somente para o rendimento e obtenção da proteína. A concentração de ureia na qual foi possível obter a proteína solubilizada foi 2 M. A purificação teve como rendimento final foi de 23,20 µg/mL. A Lci9 apresentou reatividade com os soros humanos positivos para LT, demonstrando ser uma proteína recombinante promissora para o diagnóstico desta doença, e que pode vir a ser utilizada em estudos futuros, junto a outros alvos antigênicos para desenvolvimento de um método mais eficaz para o diagnóstico precoce da LT.

Palavras-chave: Proteínas recombinantes. Leishmaniose Tegumentar. Sorodiagnóstico. ELISA.

SILVA, S.S. **Identification And Evaluation Of A Recombinant Antigen For The Serological Diagnosis Of Tegumentary Leishmaniasis.** 2023. 63. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Tegumentary leishmaniasis (LT) is an infection caused by protozoa of the genus *Leishmania sp.*, occurring in all states of Brazil. It is considered by the World Health Organization (WHO) as one of the most serious neglected diseases, affecting approximately 2 million people annually. The deformities caused by TL involve mucosal lesions, mainly in the oral and nasopharyngeal regions, and can be multiple, persistent and disfiguring. However, the diagnosis can be difficult due to the vast number of diseases that make a differential diagnosis with LT-, such as syphilis, leprosy and tuberculosis. Furthermore, in endemic areas, different species cause lesions similar to LT, making early diagnosis of the disease difficult. Serological tests do not have ideal efficiency, in addition to having cross-actions with other parasites. Thus, the use of recombinant proteins has been a promising alternative when used in serological tests, such as the ELISA, a rapid diagnostic test, demonstrating greater sensitivity (95-100%) in relation to the soluble antigens of *Leishmania (V.) braziliensis*. In this based study, we sought to evaluate the potential of the recombinant protein Lci9 in the diagnosis of tegumentary leishmaniasis. The Lci9 coding gene was subcloned into a pRSET A series expression vector. The protein was produced in a prokaryotic system, and expression conditions were standardized. A solubility test was also carried out with buffers containing different concentrations of urea. The protein was purified by receptor chromatography, and ELISA evaluations, using 10 positive sera for tegumentary leishmaniasis and 3 sera from healthy individuals. The best conditions for expression of the recombinant protein were 30°C, 0.5 mM of inducer (IPTG) and 3 hours of induction, being significant only for the yield and obtaining the protein. The urea concentration in which it was possible to obtain the solubilized protein was 2 M. The final yield was 23.20 µg/mL. Lci9 showed reactivity with human sera positive for LT, proving to be a promising recombinant protein for the diagnosis of this disease, and that may be used in future studies, with other antigenic targets for the development of a more effective method for the early LT diagnosis.

Key-words: Recombinant proteins. Tegumentary Leishmaniasis. serodiagnosis ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2018.	14
Figura 2 – Incidência de leishmaniose cutânea e mucosa por 100.000 habitantes, no segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2021.	16
Figura 3 – Formas evolutivas da <i>Leishmania spp.</i>	17
Figura 4 – Ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i>	18
Figura 5 – Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar	21
Figura 6 – Esquema ilustrativo da Lci9, evidenciando duas regiões repetitivas e as enzimas de restrição BamHI e XhoI.	30
Figura 7 – Confirmação de inserto da Lci9 por digestão enzimática	40
Figura 8 – Padronização da expressão da Lci9.....	41
Figura 9 – Teste de solubilidade.....	42
Figura 10 – Indução em larga escala da Lci9	43
Figura 11 – Purificação da proteína recombinante	44
Figura 12 – Quantificação da Lci9 por comparação entre bandas	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Padronização do anticorpo primário para ELISA com o antígeno recombinante Lci9.....	47
Gráfico 2 – Padronização do anticorpo secundário anti-IgG para o ELISA utilizando o antígeno recombinante Lci9	47
Gráfico 3 – Reatividade de soros em ensaio de ELISA	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reatividade de soros em ensaio ELISA	48
--------------------------------------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albumina Sérica Bovina
CD	Células dendríticas
DC	Doença de Chagas
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> – Ensaio imunoenzimático indireto
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> – Ácido etilenodiamino tetraacético
IgG	Imunoglobulina G
IFI	Imunofluorescência indireta
IL	Interleucina
IDRM	Teste de Intradermorreação de Montenegro
IPTG	Tiogalactopiranosídeo de isopropila
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Difusa
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MAC	Montagem do Complexo de Ataque à Membrana
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
OD	<i>Optical Density</i> – Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde

pb	Par de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SDS-PAGE	<i>Sodium DodecylSulphate - Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
TGF- β	<i>Transforming Growth Fator-beta</i> – Fator de Crescimento Transformador-beta
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Fator-alpha</i> – Fator de Necrose Tumoral -alpha
Treg	Células T regulatórias
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
xg	gravidade
μ g	micrograma
μ L	microlitro
μ m	micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	14
1.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	19
1.3 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	21
1.4 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	24
1.4.1 Testes Parasitológicos.....	25
1.4.2 Testes Moleculares.....	26
1.4.3 Testes sorológicos.....	27
1.4.5 Novas Perspectivas para o Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Humana	28
1.4.5.1 Lci9 como alvo promissor para diagnóstico sorológico da LT	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 METODOLOGIA	32
3.1 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA	32
3.1.1 Extração de DNA Plasmidial Por Lise Alcalina.....	32
3.1.2 Digestão enzimática	33
3.1.3 Sequenciamento do DNA	33
3.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	33
3.3 OBTENÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE	34
3.3.1 Padronização para expressão em larga escala	34
3.3.2 Teste de Solubilidade	34
3.3.3 Expressão das Proteínas Recombinantes	35
3.3.4 Purificação da Proteína Recombinante.....	35

3.3.5 Dosagem do Antígeno Recombinante	36
3.4 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM IMUNOENSAIOS	36
3.4.1 Amostras	36
3.4.2 ELISA	37
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4 RESULTADOS	39
4.1 ANÁLISE E OBTENÇÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE	39
4.1.1. Extração De DNA Plasmidial Por Lise Alcalina	39
4.1.1.1 Lci9	39
4.1.1.1 Sequenciamento	40
4.2 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	40
4.2.1 Padronização para expressão em larga escala	40
4.2.2 Teste De Solubilidade.....	41
4.2.3. Expressão Da Proteína Recombinante em Larga Escala.....	42
4.2.4 Purificação Da Proteína Recombinante	43
4.2.5 Dosagem Do Antígeno Recombinante.....	44
4.3 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LCI9 EM IMUNOENSAIO INDIRETO	
ELISA.....	45
4.3.1. Amostras	45
4.3.2 Padronização ELISA.....	46
4.3.2.1 Padronização do antígeno recombinante no ELISA	46
4.3.2.2 Comportamento do antígeno recombinante no ELISA	48
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	55

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são caracterizadas por um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania*. É uma doença que está diretamente relacionada a condições de saúde básica precárias, sendo assim considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2017). A leishmaniose é classificada em três formas principais: a leishmaniose visceral (LV), sendo a forma mais grave, a leishmaniose mucocutânea (LM), e a leishmaniose tegumentar americana ou cutânea (LT), a forma mais comum (BRASIL, 2017). No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LT são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. A *L. braziliensis* foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita como agente etiológico da LT (FREIRE et al., 2021), sendo a espécie mais importante e estando presente em todos os estados do país. Este protozoário provoca lesões cutâneas (ulcerativas) em partes expostas do corpo, disseminadas ou difusas que podem evoluir para lesões nas mucosas (ARONSON; JOYA, 2019).

A LT é considerada pela OMS uma das seis doenças infecciosas de maior impacto, devido ao seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de produzir deformidades. É endêmica em mais de 80 países distribuídos na América Latina, África, Ásia e Europa (WHO, 2020). No Brasil, a LT é considerada um problema de saúde pública devida à magnitude, transcendência e expansão geográfica da enfermidade, com casos presentes em todos os estados, sendo responsável por 94% dos casos de leishmaniose reportados no país no ano de 2019 (OPAS, 2020). Na Região Nordeste, Pernambuco, é identificado como um dos estados que apresenta maior número de casos reportados (NEGRÃO et al., 2014), apresentando 142 casos em 2019, com taxa de incidência de 2,1 casos por 100 mil habitantes, segundo a Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (SES-PE).

O diagnóstico da leishmaniose é realizado a partir de uma associação de fatores clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (NEVES et al., 2011). Um grande número de metodologias para o diagnóstico laboratorial foi descrito na literatura com abordagens parasitológicas, moleculares e sorológicas, variando na sensibilidade dos resultados (BRASIL, 2017). O diagnóstico da LT é realizado principalmente por meio

de métodos parasitológicos e moleculares, visto que o principal teste sorológico, o teste intradérmico de Montenegro (IDRM), que contribuía para auxiliar no manejo clínico da doença, foi descontinuado (BRAZ, 2019). No entanto, outros testes sorológicos, principalmente o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), têm apresentado resultados promissores (FREIRE et al., 2021). Os métodos parasitológicos apresentam baixa sensibilidade, enquanto técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) que mesmo apresentando alta sensibilidade e especificidade, são complexas e possuem custo elevado, sendo restritas a poucos hospitais e centros de pesquisa. Os métodos sorológicos mais utilizados, imunofluorescência indireta (IFI) e o ELISA, apresentam sensibilidade variável de acordo com o ensaio aplicado, e a especificidade depende do antígeno utilizado (BRITO et al., 2020). No entanto, estes testes, apesar de serem indicados para áreas endêmicas por serem de fácil manipulação e menos invasivos, não são recomendados para o diagnóstico da LT, devido a discrepâncias relacionadas com a sensibilidade e especificidade. Além disso, a ocorrência de reação cruzada com outros tripanossomatídeos é uma das maiores limitações desses ensaios (GOTO et al., 2010).

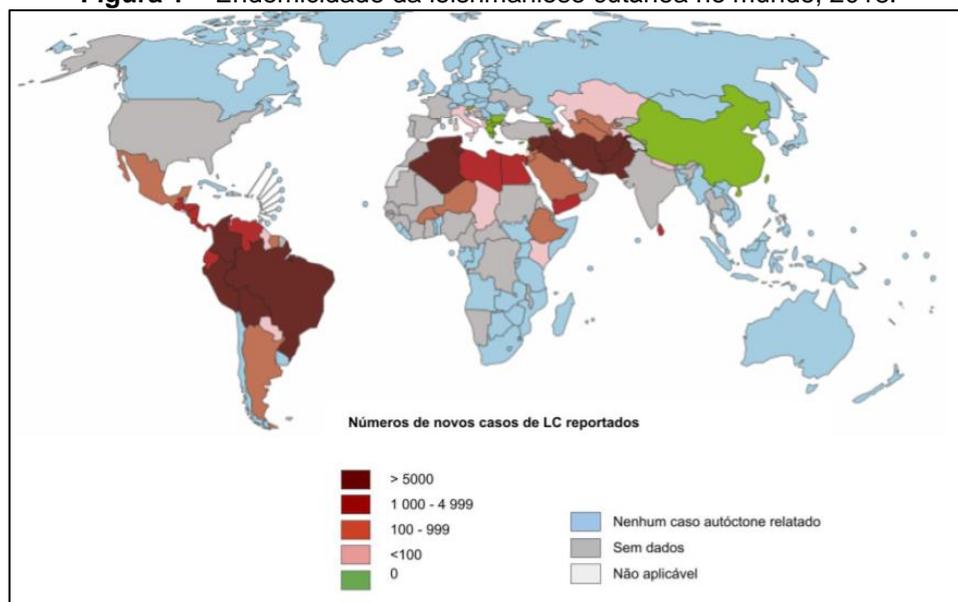
O diagnóstico precoce é considerado como medida fundamental para o controle da LT, por reduzir sua transmissão e, conseqüentemente, a prevalência da doença, evitando incapacidades e mortes (PENA et al., 2020). Uma alternativa para se aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos e permitir a detecção precoce é a utilização de antígenos recombinantes, derivados de proteínas nativas do parasita identificadas como capazes de induzir uma resposta imune mais eficiente (ZANETTI et al., 2019). Entretanto, no caso da LT, existe uma carência de antígenos que se enquadram nessa situação. A partir disso, este estudo buscou avaliar um novo antígeno recombinante para o diagnóstico da LT. Este antígeno foi originalmente isolado de *Leishmania infantum*, mas se revelou promissor para o diagnóstico da LT e, em estudos futuros, sua aplicação pode ser relevante para o desenvolvimento de proteínas quiméricas recombinantes utilizadas no diagnóstico dessa doença.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é considerada uma infecção de evolução crônica, não transmissível, sendo considerada um agravo de saúde principalmente em populações marginalizadas, usualmente inseridas em condições precárias de recursos higiênico-sanitários, econômicos, sociais e humanos, comum em áreas tropicais e subtropicais (NEGRAO, 2014). Segundo a OMS, a LT é uma doença endêmica em 98 países e distribuída em quatro continentes: Ásia, África, Europa e América (WHO, 2018) (Figura 1). Anualmente há 1,0 a 1,5 milhão de novos casos de LT e uma população numerosa está em risco em áreas endêmicas (ANVERSA et al., 2018). Apesar de sua crescente incidência mundial, é uma doença tropical negligenciada e, de acordo com um relatório divulgado pela OMS, os anos de vida ajustados por incapacidade (do inglês *disability-adjusted life years* – DALYs) perdidos devido à leishmaniose aumentaram 43,5% entre os anos de 1990 e 2016 (HOTEZ, 2018).

Figura 1 – Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2018.

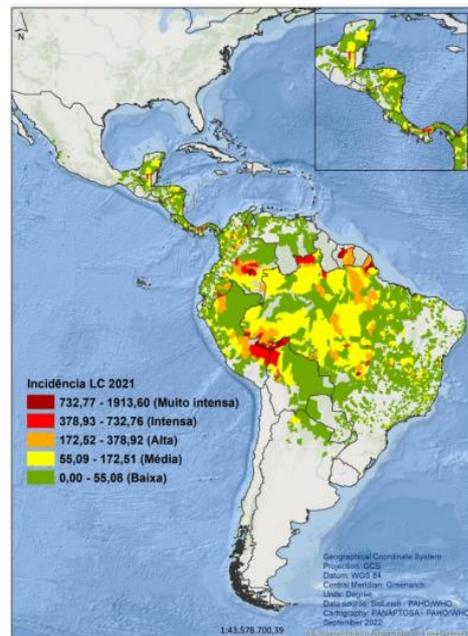


Fonte: Adaptado. WHO, 2018. Leishmaniose - situação epidemiológica (<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>)

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) apresentou dados que demonstram as notificações nos países endêmicos para a doença. Nestes, um recorte temporal, de 2001 a 2017, apresenta um total de casos novos em torno de novecentos mil para Leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) e, nesse cenário, o Brasil fica responsável por mais de 70% dos casos de leishmaniose tegumentar (OPAS, 2019). No território nacional, a LT apresenta maior prevalência de notificação nas Américas, tendo casos confirmados em todos as regiões do país (OPAS, 2022) (Figura 2). De acordo com dados retirados de levantamentos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no ano de 2019, foram confirmados 16.132 casos novos de LT no Brasil, com os maiores percentuais de casos registrados nas regiões Norte (43,7%) e Nordeste (29,9%) (BRASIL, 2020).

No Nordeste, região que apresenta o segundo maior percentual de notificações realizadas no país, os estados do Maranhão, Ceará, Bahia e Pernambuco apresentam um número significativo de casos notificados, respondendo por 95,73% de todos os casos dessa região (GOMES et al., 2022). O estado de Pernambuco (PE) apresenta elevado número de casos notificados entre trabalhadores rurais, que estão constantemente expostos a localidades endêmicas e fatores de risco, como moradias próximos às florestas e sem telas de proteção contra os insetos vetores, e a falta de acesso a serviços de saúde capacitados nessas regiões (MELO et al., 2020). Portanto, é necessária uma vigilância constante das áreas endêmicas quanto aos aspectos ambientais, econômicos e sociais (BRASIL, 2021).

Figura 2 – Incidência de leishmaniose cutânea e mucosa por 100.000 habitantes, no segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2021.

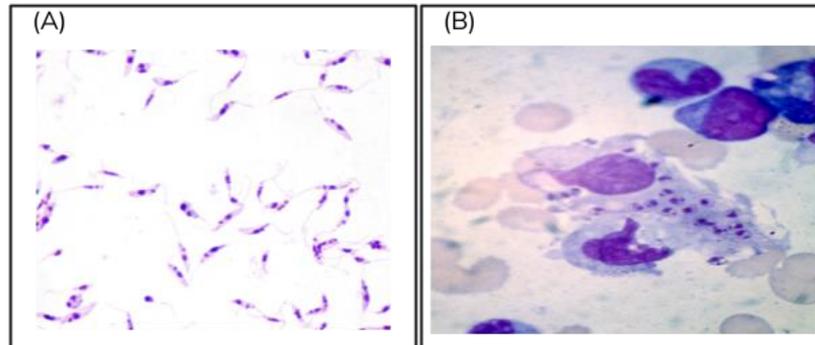


Nota: Dados notificados pelos programas de leishmanioses e serviços de vigilância dos países.
LC: leishmaniose cutânea em 2022.

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

As leishmanioses são causadas por protozoários intracelulares da família *Trypanosomatidae*, pertencendo a dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (NEVES, 2016). Apresentam duas formas principais durante o seu ciclo de vida: a forma promastigota, de morfologia alongada e flagelada, encontrada no trato digestivo do vetor, os flebotomíneos (Figura 3A); e a forma amastigota, presente em células fagocitárias dos tecidos dos hospedeiros vertebrados e que aparecem à microscopia óptica como organismos ovais, esféricos ou fusiformes, apresentando um núcleo grande e arredondado que ocupa aproximadamente um terço do corpo do protozoário (Figura 3B) (OPAS, 2021).

Figura 3 – Formas evolutivas da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado OPAS, 2021.

Nota: Formas evolutivas da *Leishmania* spp. (A) Forma promastigota em meio extracelular. (B) Forma amastigota do parasito no interior de macrófagos.

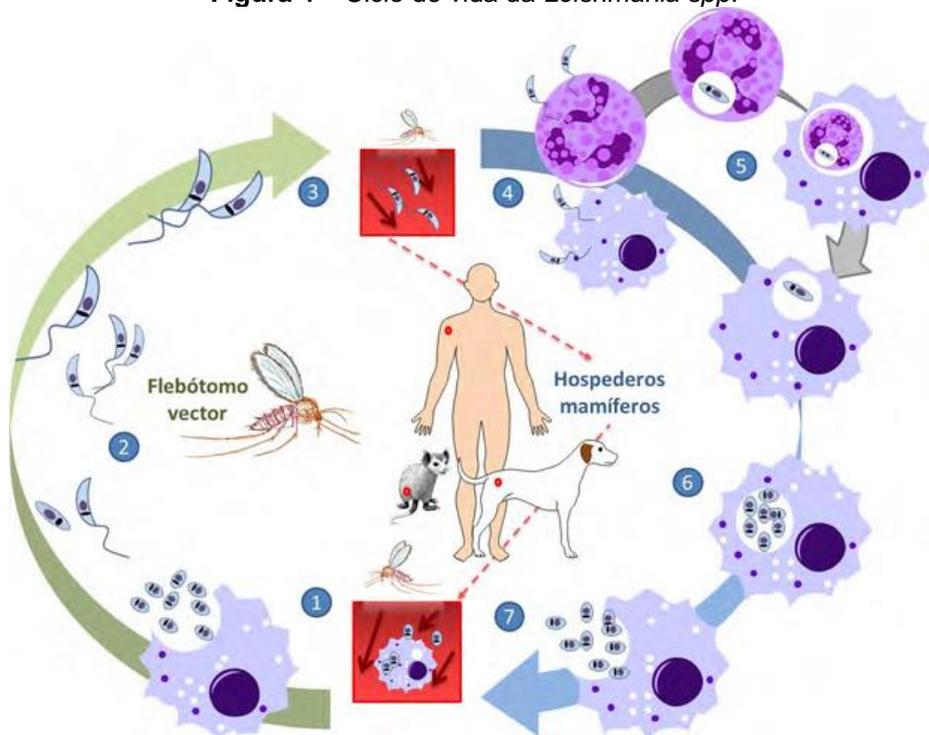
São descritas dozes espécies causadoras de LT humana nas Américas e oito espécies que provocam a doença em animais. No Brasil, existem sete principais espécies identificadas, sendo seis delas pertencentes do subgênero *Viannia*. As espécies desse subgênero incluem as *L. (V) braziliensis*, *L.(V) guyanensis*, melhor conhecidas, assim como espécies mais recentemente identificadas nas regiões Norte e Nordeste, as *L. (V) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L (V.) shawi*. A sétima espécie, do subgênero *Leishmania*, é a *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017). A maior responsável por lesões, segundo estudos é a *L. (V.) braziliensis*, estando amplamente distribuída no território brasileiro (COSTA, 2014).

A LT é uma infecção dermatológica que tem origem na infecção por protozoários na forma de promastigota, presente na luz do trato digestivo dos insetos vetores. Sua transmissão é dada pela picada das fêmeas de flebotomíneos da ordem Diptera; família *Psychodidae*; sub-família *Phlebotominae*, gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (PEREIRA et al., 2017). Dependendo da região geográfica, os vetores são conhecidos habitualmente como mosquito-palha, birigui, tatuquira, asa branca e asa dura (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Mundialmente, são encontradas mais de 500 espécies, porém, somente 30 delas foram relatadas como vetores (RANGEL et al., 2018). As espécies correlacionadas à transmissão da LT no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (VASCONCELOS et al., 2018).

O ciclo biológico do parasito *Leishmania* (Figura 4) inicia a partir do repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea infectado, que apresentam as formas infectantes – promastigotas nas glândulas salivares (BATES, 2018; TORRES-GUERRERO et al.,

2017). O parasito é então transferido para a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado pela injúria tecidual. Ocorre, então, a ativação do sistema imune, levando à interiorização deste parasita que se apresenta como parasita intracelular obrigatório, diferenciando-se então em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Os parasitos multiplicam-se até romperem a membrana celular e serem libertos na corrente sanguínea, podendo infectar outras células (MANN et al., 2021). Nesse momento, quando fêmeas flebotomíneos não infectadas se alimentam do sangue do hospedeiro vertebrado infectado, formas amastigotas são ingeridas juntamente com algumas células do sistema mononuclear fagocitário infectados com o parasito. Elas então que se aloca na parte anterior do trato intestinal do inseto e ali evoluirão, por meio de intensa multiplicação, tornando-se novamente formas promastigotas (BATES, 2018; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Estas, por sua vez, sofrem inúmeras divisões binárias e migram para a faringe e esôfago do vetor e tornam-se infectantes. O ciclo é reiniciado quando novamente o vetor infectado se alimenta do hospedeiro vertebrado e inocula o parasito (NEVES, 2016; BRASIL, 2017).

Figura 4 – Ciclo de vida da *Leishmania spp.*



Fonte: Adaptado OPAS, 2021.

Nota: Desenho esquemático do ciclo de vida do parasita *Leishmania spp.*

Legenda: 1- Fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo ingerem macrófagos infectados com as formas amastigotas; 2- Formas amastigotas se reproduzem por divisão binária e rapidamente se transformam na forma promastigota metacíclicas na porção posterior no intestino do inseto vetor; 3- Migração para a probóscide do inseto e inoculação no hospedeiro vertebrado durante repasto sanguíneo. 4- Interiorização das formas promastigotas em células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente os macrófagos e desenvolvimento da forma amastigota; 5- Infecção em novas células do sistema mononuclear fagocitário por fagocitose de restos celulares e células infectadas; 6- Multiplicação por divisão binária das formas amastigotas nas células infectadas; 7- Rompimento das células e a liberação das amastigotas que serão ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo.

1.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

As leishmanioses caracterizam-se como um conjunto de doenças que apresentam manifestações clínicas e imunopatológicas distintas. As espécies envolvidas nos mecanismos de infecção da LT que demonstram maior potencial de patogenicidade são: *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. No entanto, a manifestação clínica da LT não se relaciona apenas à espécie envolvida, mas também à resposta imunológica, fatores genéticos e ao estado nutricional do indivíduo infectado, o que caracteriza a intensidade da resposta imune (LEITE, 2019). As principais formas clínicas observadas na LT são: cutânea (LC) e mucocutânea (LM), que podem apresentar-se em diferentes situações clínicas (Figura 5). É possível ainda observar casos de infecções assintomáticas, aquelas nas quais indivíduos são expostos ao parasito, porém não desenvolvem lesões, podendo ocorrer em cerca de 10% dos indivíduos (BEST et al., 2018). Estas infecções só podem ser identificadas por meio da sorologia positiva ao agente infeccioso, sugerida pelo teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (IBARRA-MENESES et al., 2022).

A manifestação mais comumente encontrada da leishmaniose tegumentar é a LC, que pode se apresentar de forma localizada (LCL), disseminada (LCD) ou difusa (LD) (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). A forma localizada (Figura 5a) consiste na presença de úlceras única ou múltiplas (até 20 lesões) presentes em regiões expostas do infectado nas quais o vetor inocula os parasitas, como membros inferiores e superiores bem como na face e pescoço (MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019).

As lesões apresentam-se tipicamente como úlceras indolores com bordas infiltradas bem delimitadas e fundo granuloso, evoluindo, na maioria dos casos, para cura espontânea e apresentando boa resposta ao tratamento. Todas as espécies podem provocar o quadro da LCL, no entanto, normalmente está relacionada a *L. (V.) braziliensis* (GUREL; TEKIN; UZUN, 2020).

A forma disseminada da LT apresenta características semelhantes à LC, diferenciando-se pelo número aumentado de lesões mistas (por exemplo, acneiformes, papulosas, nodulares ou ulceradas) (Figura 5b). A LCD é uma expressão relativamente rara, que pode ser observada em até 2% dos casos, apresentando numerosas lesões nodulares ou ulcerativas distribuídas por todo o corpo do indivíduo afetado. As espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são a *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*. A espécie *L. (V.) braziliensis* é, entretanto, conhecida como sendo responsável pelo maior número dos casos (BRASIL, 2017; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019).

Já a LD é uma manifestação grave e rara associada à resposta imunológica celular inadequada do hospedeiro, causada principalmente pela *L. (L.) amazonensis* (CHRISTENSEN et al., 2019). Esta forma é caracterizada pela infiltração difusa de formas amastigotas do parasita na pele e o surgimento de lesões cutâneas fechadas, tais como pápulas, tubérculos, placas infiltradas e nódulos, que raramente ulceram, cujo desafio é a má resposta terapêutica devido às recidivas constantes (Figura 5c) (SAMPAIO et al., 2021). E por fim, a forma LM, que está relacionada com a cronicidade da forma cutânea e, em geral, é transmitida pela *Leishmania (V.) braziliensis*. A ferida primária apresenta as mesmas características da cutânea localizada, que ao mesmo tempo, ou meses depois, se desenvolve em metástases nas mucosas das vias aéreas superiores. Estas destroem a cartilagem nasofaríngea, laringea e oral, resultando em deformações graves. Mais raramente, pode haver comprometimento de conjuntivas oculares e mucosas de órgãos genitais e ânus (Figura 5d) (ABADÍAS-GRANADO et al., 2021).

Figura 5 – Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar



Fonte: Adaptado OPAS, 2021.

Nota: Manifestações clínicas da LT. A- Forma da Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL); B- Forma da Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD); C- Forma da Leishmaniose Cutânea Difusa (LD); D- Forma da Leishmaniose Mucocutânea (LM).

1.3 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Grande parte do conhecimento acerca da resposta imune mediada por células e aspectos da relação parasito-hospedeiro na leishmaniose tegumentar foi obtida através de estudos *in vivo* e *in vitro*. A infecção em camundongos com promastigotas de *L. major* é o melhor modelo de estudo das doenças crônicas infecciosas que envolvem a ativação de células T (SERRANO-COLL et al., 2021). Camundongos geneticamente susceptíveis desenvolvem lesões cutâneas no sítio de inoculação e falham no desenvolvimento de uma resposta imune ao parasito mediada por células; já camundongos resistentes parecem curar-se rapidamente, graças a uma forte resposta imune celular, e tornam-se resistentes a novas reinfecções. Todavia, dados obtidos no modelo animal apresentam limitações relacionadas a diferenças genéticas entre humanos e os animais utilizados, assim como na via de inoculação de promastigotas, que é realizada normalmente por via subcutânea ou intravenosa. Essa forma de inoculação não leva em consideração fatores adicionais presentes na saliva do flebotomíneo que influenciam as respostas imunes precoces (ABDELADHIM et al., 2011).

As células da imunidade inata são essenciais para o curso da infecção e, embora os macrófagos sejam as células hospedeiras primárias dos parasitas *Leishmania spp.*, células como neutrófilas e células dendríticas apresentam papéis importantes e distintos na formação da resposta imune à infecção. Os neutrófilos, que são rapidamente recrutados para o local da infecção por *Leishmania spp.*, interagem de acordo com a espécie do parasita. Podem agir fagocitando macrófagos infectados, mas também podem ser contaminados e servir como reservatório dos parasitos (OUALHA et al., 2019).

A *Natural Killer* (NK) é a principal célula na linha de defesa, atuando no combate à infecção devido ao seu papel citotóxico a partir da produção de citocinas pró inflamatórias como o TNF e IFN- γ . Esta última é uma citocina chave para a ativação de macrófagos e consequente eliminação do parasita (MESSLINGER et al., 2018). As células dendríticas desempenham um papel fundamental na imunopatogênese da LT e são as principais células apresentadoras de antígenos, responsáveis pela comunicação entre as células da imunidade inata e adaptativa. A partir do momento em que essas células interagem com *Leishmania spp.* no local da infecção, há um aumento na expressão de moléculas coestimuladoras, como CD40, CD80 e CD86, que são essenciais para a ativação das células T virgens presentes nos órgãos linfoides (TIBÚRCIO et al., 2019).

O sistema complemento desempenha um papel pró-inflamatório no combate à doença através de suas vias de ativação, com a conformação da C3 convertase, que é crítica na montagem do complexo de ataque à membrana (MAC), contribuindo para a lise osmótica do parasita (ROCHA, 2019). Os macrófagos estão envolvidos na proliferação do parasito, por serem as principais células infectadas, servindo como células hospedeiras. Também atuam como células apresentadoras de antígeno para os linfócitos TCD4+ e TCD8+. Podem ser ativadas diretamente pelo parasito, mas também por citocinas, como o IFN- γ , produzido por células TCD4+ do perfil Th1 e NK. Quando ativadas, passam a sintetizar intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo, que resultam na destruição intracelular parasitária (DE ARAÚJO et al., 2021).

Avanços no entendimento da doença revelam que tanto em camundongos, como em humanos uma resposta celular complexa dita o resultado da doença. A resposta imune protetora para a infecção é primordialmente mediada por células T com expansão de células CD4+. De maneira geral, a diferença entre resistência e

susceptibilidade à infecção está associada ao nível de expansão de células Th1 e Th2, respectivamente. Com isso, o resultado clínico da infecção por *Leishmania* depende do equilíbrio entre as citocinas ativadoras das células de perfil Th1 e Th2. (OLIVEIRA et al., 2021) Os linfócitos com perfil Th1 se direcionam ao local da infecção e ao se instalar, aumentam a produção de Interferon-gama, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina (IL-2). O IFN- γ ativa os macrófagos e a Interleucina-12 promove o aumento da atividade leishmanicida. O IFN- γ produzido age como um sinal de um longo alcance de forma a estimular a produção de óxido nítrico pelas células infectadas, dessa forma, suprimindo a desigualdade da distribuição das células TCD4+ nas lesões (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Os linfócitos TCD4+ Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que estão associadas com a suscetibilidade a infecções e inibição da função microbicida dos macrófagos, colaborando com a incapacidade de controle parasitário e levando à disseminação do protozoário pela pele. A Interleucina-4 (IL-4), principal marcador utilizado como marcador da resposta Th2, tem sido detectada nos casos de leishmaniose cutânea difusa e mucocutânea, que são as formas mais graves da leishmaniose tegumentar (OLIVEIRA et al., 2021).

Estudos com *L. (V.) braziliensis* demonstram que na resposta à leishmaniose cutânea e mucosa atua um subtipo celular conhecido como Th17. Este subtipo está relacionado com a produção de IL-17 que aumenta a produção de mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- α e NOS. Resposta Th17 e Th1 atuam auxiliando os linfócitos quando há necessidade maior de uma inflamação tecidual por patógenos resistentes a ação do Th1 (SAUTER et al., 2019). A IL-10, juntamente ao Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β) e ácido retinóico, atuam na diferenciação das células regulatórias (Treg), e, assim, ativam o perfil Th3. O principal grupo de Tregs é caracterizado pela expressão constitutiva de altos níveis do receptor α da interleucina-2 (CD25+) e do fator de transcrição Foxp3 (BARROS et al., 2018). Durante essa diferenciação, as células Th17 produzem interleucina-21 que amplifica a indução das células Th17. Para ocorrer a estabilização do fenótipo Th3, as IL-6 e IL-21 atuam promovendo a expressão de receptores da interleucina-23. A IL-23, por sua vez, é capaz de estabilizar as células Th17 (GOMES et al., 2017).

Estudos relacionados à ação da resposta humoral na LT demonstram que as células B são potentes apresentadoras de antígenos, capazes de ativar as células T

virgens. Além disso, estão relacionadas com aumento de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, como IFN- γ , TNF, IL-13 e IL-6. Também foi relatada a ação de anticorpos anti-*Leishmania* por meio da lise das formas promastigotas em sinergia com o sistema complemento, auxiliando na fagocitose das células infectadas e dos restos celulares da *Leishmania*. Além disso, estudos apontam que o nível de resposta de anticorpos parece refletir a densidade do parasita e a intensidade da infecção (VOLPEDO et al., 2021).

Estudos atribuem que a cura da forma tegumentar da leishmaniose depende de uma batalha constante entre o sistema imune do hospedeiro e os mecanismos de evasão do parasito, em que a resposta mediada por Th1, com expressão de INF- γ , aumenta a imunidade mediada por células, resultando no controle da infecção (QUINNELL et al., 2003; BRACHELENTE et al., 2005; BARNES et al., 2006). Já a resposta mediada por Th2 é predominantemente humoral, com exacerbação dos sinais clínicos da infecção, associada a uma produção de IL-4, que suprime a resposta de Th1 (SAUTER et al., 2019). Na leishmaniose cutânea e mucocutânea é observado a predominância de um perfil de resposta Th1, na qual a última apresenta uma resposta Th1 exacerbada devido ao aumento do número de células T citotóxicas CD8+, responsável pela gravidade da doença. Por outro lado, na leishmaniose difusa é notado um perfil de resposta Th2, diretamente associada a altos títulos de anticorpos. Além disso, indivíduos com LCD produzem alta níveis da citocina reguladora interleucina-10 (IL-10) (CUNHA et al., 2020).

1.4 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O diagnóstico da leishmaniose é baseado em critérios que envolvem dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. A acurácia e a rapidez do diagnóstico final são fundamentais para garantir o tratamento rápido e adequado do paciente e estabelecer estratégias de intervenção importantes para o controle dessa doença (REIMÃO et al., 2020). Atualmente, não existe uma estratégia de tratamento eficaz, acessível e segura, nem uma vacina aprovada contra a LT, reforçando a necessidade

de desenvolver novas estratégias de diagnóstico precoce a fim de controlar a disseminação e permitir um tratamento nas fases iniciais da doença (BRITO, 2020).

1.4.1 Testes Parasitológicos

Os testes parasitológicos consistem na visualização de formas amastigotas do parasita e ainda são considerados padrão ouro para o diagnóstico da LT, devido à sua alta especificidade (até 100%) (SUÁREZ et al., 2015; REIMÃO et al., 2020). Normalmente são realizados por meio de análise de material de lesões suspeitas obtidos por biópsia ou raspados (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). Os métodos parasitológicos mais utilizados são: pesquisa direta; isolamento em cultura e inoculação em animais (ARONSON; JOYA, 2019).

A técnica de pesquisa direta consiste na identificação das formas amastigotas em lâminas a partir de material obtido da lesão por escarificação ou punção aspirativa. Todas utilizam um microscópio óptico de luz, após a coloração por Giemsa, Wright ou Panótico. As análises podem ser realizadas em de lâminas preparadas pela impressão por aposição da amostra ou do fragmento do tecido obtido por biópsia (THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). Normalmente, o material contido na margem da úlcera costuma apresentar maior quantidade de parasitos. Foi observado que entre esfregaços de raspagem e citologia aspirativa há uma diferença significativa entre os dois métodos em favor da última na detecção de amastigotas, bem como do conforto do paciente. Entretanto, embora seja uma técnica simples, depende da habilidade técnica dos analistas, o que contribui para uma menor sensibilidade do método (60 – 95 %) (PENA et al., 2020). Ademais, a carga parasitária na lesão diminui à medida que a lesão progride, sendo dessa forma incapaz de detectar parasitos em todos os indivíduos (THOMAZ et al., 2021).

Na técnica de isolamento do parasito para cultura *in vitro* são utilizados diversos meios de cultura apropriados à temperatura ambiente (24-26°C). O meio mais empregado para isolamento é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle – NNN, e suas modificações (BRASIL, 2017). Para o teste, se utiliza amostras obtidas a partir de punção aspirativa ou biópsia de lesões cutâneas. A sensibilidade global do

método está em torno de 50% para *L. (V.) braziliensis*. Esse procedimento, contudo, exige condições laboratoriais e pessoal treinado, muitas vezes não disponível em nosso país, o que a torna inadequada, além do resultado demandar tempo, podendo ser obtido em horas, dias ou até mesmo semanas, dependendo da metodologia empregada (VASCONCELOS et al., 2018).

Outra forma de diagnóstico parasitológico é a inoculação em animais de laboratório, no modelo de estudo, o hamster (*Mesocricetus auratus*), nas patas posteriores ou focinho. Além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal (2 a 9 meses, em média), a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* (BRASIL, 2017).

1.4.2 Testes Moleculares

Muitos testes de diagnóstico molecular foram desenvolvidos para a detecção de leishmaniose em espécimes de lesões cutâneas, uma vez que estes apresentam boa sensibilidade (98,8%) e especificidade (100%) quando comparados aos métodos de diagnóstico tradicionais, e permitem o uso de amostragem menos invasiva para o diagnóstico (THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). Em particular, a PCR, seja como teste único ou em formato aninhado (Nested-PCR) ou como ensaio quantitativo (qPCR), tem sido amplamente explorada. De maneira geral, os testes baseiam-se na detecção de sequências de DNA parasito-específico amplificadas, a partir de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Além de requerer menos material para análise, a técnica tem como vantagem a capacidade de caracterizar taxonomicamente a *Leishmania spp.*, o que favorece o direcionamento ao tratamento (MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2018). No entanto, a especificidade do teste está diretamente relacionada com a sequência alvo utilizada, sendo os principais o DNA cinetoplasto (kDNA), sequências de SNA codificadoras de RNA ribossômico (rDNA) e lócus do mini-exon. Dessa forma, o método molecular não é tão aplicável por devido ao alto custo e por requerer estrutura laboratorial adequada e operadores qualificados, sendo menos utilizada em laboratórios com recursos restritos, além da necessidade de padronização metodológica (GALLUZZI et al., 2018).

Na tentativa de contornar parcialmente esses requisitos, plataformas de diagnóstico isotérmico (LAMP) foram desenvolvidas nos últimos anos. A amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos, uma reação isotérmica visando o RNA do parasita, foi desenvolvida para a leishmaniose. A oligocromatografia para análise pós-amplificação evita ainda mais o uso de equipamentos complexos, preservando características apropriadas de desempenho de diagnóstico (MESA et al., 2020).

1.4.3 Testes sorológicos

Os testes sorológicos de diagnóstico para LT são baseados na identificação da resposta imune celular e/ou humoral desenvolvida no organismo do indivíduo acometido pela infecção. O diagnóstico indireto baseado em sorologia tem sido uma estratégia alternativa por muitas décadas, e ainda continua amplamente utilizado devido à sua facilidade de execução em amostras de soro ou plasma (LÉVÊQUE et al., 2020). Dentre esses métodos, os mais utilizados dentro da rotina laboratorial são: a técnica de IFI e o ELISA. Embora considerados menos invasivos para obtenção de amostras do que os métodos parasitológicos, esses ensaios têm sensibilidade (78–95) e/ou especificidade (82–100) variável, dependendo do antígeno utilizado, do estado clínico dos indivíduos e da coexistência de reações cruzadas com outras doenças (BRITO, 2020; BARROSO-FREITAS et al., 2009).

O método de IFI baseia-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostra líquida utilizando anticorpos específicos ligados a uma fase sólida, na qual há a formação de um imunocomplexo. Apesar de ser um método sorológico considerado sensível (81,5%) existe a possibilidade de reações cruzadas, principalmente com o *Trypanosoma cruzi* (KAR, 1995; BARROSO-FREITAS et al., 2009, BRITO et al., 2020) e outros organismos da família *Trypanosomatidae*, gerando falso-positivos para portadores de doenças, como doença de Chagas e leishmaniose visceral. Este teste pode apresentar resultados variáveis para LT, devido à reduzida antigenicidade do parasita ou a baixos níveis de anticorpos circulantes. Em indivíduos com lesões cutâneas, a sensibilidade da IFI é estimada em 71% (ALBUQUERQUE et al., 2023). Além disso, as reações tendem a ser negativas no início da infecção (1 a 3

meses), ao contrário da busca direta, que tende a ser positiva (CHIARI et al., 1973). Os títulos de anticorpos são elevados em indivíduos com lesões múltiplas (SCOTT; NOVAIS, 2016), mas após tratamento e cura clínica, os títulos podem diminuir ou desaparecer em poucos meses (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O ELISA é comumente utilizado para diagnosticar a leishmaniose visceral e apresenta maior sensibilidade para o diagnóstico de LT do que os testes parasitológicos (SOUZA et al., 2013). Muitos trabalhos relatam que a técnica de ELISA apresenta maiores valores de sensibilidade (75,6%) em relação ao teste de IFI, porém esses resultados são diretamente relacionados ao tipo de antígeno utilizado no ensaio (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOMES et al., 2014; BARROSO-FREITAS et al., 2009). Testes de ELISA usando antígenos brutos, purificados ou recombinantes de *Leishmania* mostraram taxas de sensibilidade variando de 85% a 100% (GOTO; LINDOSO, 2010; PENA et al., 2020). De forma geral, as principais limitações são a presença de reações cruzadas, sensibilidade e especificidade variáveis e a não correlação dos níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença (MENDES et al., 2019).

1.4.5 Novas Perspectivas para o Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Humana

A maioria dos testes sorológicos atualmente disponíveis são preliminares, baseados em um lisado total do parasita ou de promastigota total. Embora as técnicas realizadas tenham alta sensibilidade, elas carecem de especificidade, gerando resultados falsos positivos, devido à reatividade cruzada com outras doenças, como a doença de Chagas (DC), principalmente associada ao compartilhamento de proteínas semelhantes por proximidade filogenética com o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Além disso, há uma variação importante na reprodutibilidade das preparações refletindo na sensibilidade dos testes sorológicos (ZANETTI et al., 2019).

Pesquisas recentes sugerem que a incorporação de preparações específicas de antígenos purificados ou antígenos recombinantes, obtidas a partir de sua expressão em bactérias transformadas com genes de *Leishmania spp.*, para o diagnóstico sorológico aumentaria as características operacionais desses testes

(FREIRE et al., 2021; PAGNIEZ et al., 2023). O aumento no número de estudos coincide com a interrupção da produção do antígeno da Teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) no Brasil em 2015, que extinguiu o imunodiagnóstico simples e rápido para LT, que apresenta bons parâmetros de sensibilidade (em torno de 90%), porém, com especificidade relativamente baixa (75%) (GOMES et al., 2014; BOGGILD et al., 2010), devido ao grande número de reatividade cruzada com várias outras patologias como doença de Chagas, micoses subcutâneas, tuberculose e hanseníase virchowiana (GOMES et al., 2014; PINEDA et al., 2001). Esse fato pode ter impulsionado pesquisas direcionadas para a descoberta de novas ferramentas diagnósticas. O emprego de antígenos recombinantes parece, de fato, ser uma boa alternativa para melhorar a qualidade do IDRM e dos testes sorológicos existentes, pois se baseiam na produção de antígenos mais seletivos para detecção de anticorpos em LT, uma vez que os indivíduos com essa condição produzem baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, principalmente aqueles que desenvolvem LC (FREIRE et al., 2021; VALE et al., 2022).

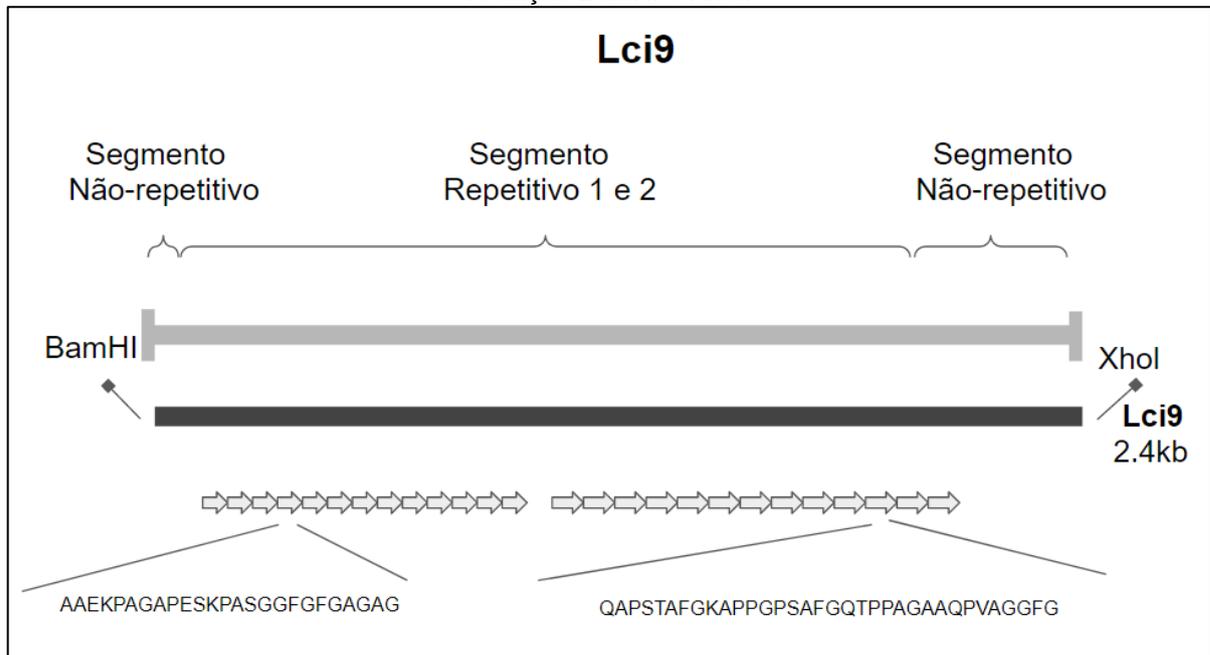
1.4.5.1 Lci9 como alvo promissor para diagnóstico sorológico da LT

Com base em estudos anteriores, nos quais foi efetuado o rastreamento em uma biblioteca genômica de uma série de proteínas antigênicas e sua avaliação para diagnóstico da LV, observou-se a possibilidade da utilização da proteína recombinante Lci9 (LmjF.28.3010), de *Leishmania infantum*. Em ensaios de ELISA esta proteína apresentou 56% de sensibilidade cruzada em indivíduos de LT sendo maior que a sensibilidade em indivíduos com LV (MAGALHÃES et al., 2017). A partir desta análise preliminar esta proteína foi considerada viável para investigar o seu uso para o diagnóstico da LT.

O gene da Lci9 possui tamanho predito de 2400 pares de base (pb) e expressa uma proteína composta de extremidades N- e C-terminais curtas e uma região central

contendo motivos repetitivos sendo a primeira de 14 repetições de um motivo com 25 aminoácidos seguida de outras 11 repetições com um motivo de 34 aminoácidos.

Figura 6 – Esquema ilustrativo da Lci9, evidenciando duas regiões repetitivas e as enzimas de restrição BamHI e XhoI.



Fonte: Adaptado de Magalhães, 2017.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e avaliar o antígeno recombinante Lci9 com potencial uso para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I- Avaliar e identificar a Lci9 para o diagnóstico da LT;
- II- Produzir a proteína recombinante em sistema de expressão heteróloga;
- III- Padronizar o ELISA empregando a proteína recombinante com antígeno.

3 METODOLOGIA

3.1 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA

3.1.1 Extração de DNA Plasmidial Por Lise Alcalina

O DNA plasmidial da Lci9 (já clonado em pRSET) foi obtido da biblioteca de DNA do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães. Foi realizada uma extração por lise alcalina, utilizando o kit comercial da Zymo PURE™ Plasmid Miniprep Kit.

Células bacterianas foram cultivadas em 2ml de meio LB (Luria Bertani) (Composição (g/l): Triptona 10,0, Extrato de Levedura 5,0, Cloreto de Sódio 5,0 pH Final: 7,2) contendo $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina, por 16-18 horas, a 37°C sob agitação a 200 rpm. As células foram recolhidas após centrifugação a $9.300 \times g$ por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartada. As bactérias foram ressuspendidas em $200 \mu\text{l}$ da solução A (50 mM de glicose, 25 mM de Tris, 10mM de EDTA, pH 8.0), misturada duas vezes por inversão, e adicionadas com $400 \mu\text{l}$ da solução B (NaOH (0,2 N) + SDS 1%) seguida de incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados $400 \mu\text{l}$ da solução C, e após leve agitação, seguiu-se incubação em gelo por 20 minutos. O material foi, então, centrifugado a $15.700 \times g$ por 20 minutos por temperatura ambiente, e transferiu-se $800 \mu\text{l}$ do sobrenadante para outro tubo contendo $600 \mu\text{l}$ de isopropanol. Cada tubo foi agitado 10 vezes por inversão e incubado a -20°C por 2 horas, com posterior centrifugação a $15.700 \times g$ por 15 minutos a 4°C .

O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol a 70% gelado, centrifugado a $15.700 \times g$ por 5 minutos a 4°C e deixado secar a temperatura ambiente. O precipitado obtido foi dissolvido em $30 \mu\text{l}$ de água contendo RNase para uma concentração final de $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ com posterior incubação de 30 minutos a 37°C . Cada material obtido da extração foi analisado por corrida eletroforética em gel de agarose a 1%.

3.1.2 Digestão enzimática

Para a análise da presença do inserto foi realizada digestão enzimática dupla com as enzimas BamH I e Xho I e o resultado foi analisado em gel de agarose a 1%.

3.1.3 Sequenciamento do DNA

A sequência de nucleotídeos da extração realizada foi confirmada por sequenciamento automático *3500 xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). A análise do sequenciamento procedeu-se por meio do pacote DNASTAR versão 5.0 (DNASTAR Inc.). O alinhamento entre o resultado obtido e a sequência de referência foi realizado utilizando-se o programa SeqMan.

3.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Os clones foram submetidos à transformação nas linhagens bacterianas *E. coli* DE3: BL-21, Rosetta, pLysS, enquanto que o material genético está já inserido no vetor de expressão pRSET A. Para a transformação, 3 µL do gene extraído foram adicionados a tubos de microcentrífuga contendo 50 µL de bactérias competentes, seguido de incubação por 30 minutos em gelo. Passado esse tempo, os tubos foram mantidos em banho maria a 37° C por 5 minutos. Após este período, o volume total da mistura foi semeado em placas de ágar LB (Composição (g/l): Triptona 10,0, Extrato de Levedura 5,0, Cloreto de Sódio 5,0 pH Final: 7,2), contendo 50 µg.mL⁻¹ de ampicilina e 25 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol para a transformação de Rosetta e pLysS. Posteriormente, foi realizada incubação a 37°C por 16-18 horas.

3.3 OBTENÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

3.3.1 Padronização para expressão em larga escala

Após a transformação e obtenção dos clones recombinantes, foi realizada indução da expressão proteica, cujas condições ótimas de lise e expressão foram estabelecidas em pequena escala (10 ml). Foram testadas as bactérias transformadas *E. coli* DE3 BL21, Rosetta, pLysS em meio LB com 100 µg/mL-1 de ampicilina para *E. coli* DE3 BL21 e com 100 µg/mL-1 de ampicilina e 25 µg/mL-1 cloranfenicol para as demais linhagens. Ao atingir a densidade óptica de 0,8 com comprimento de onda de 600 nm, foi acrescentado IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) para uma concentração final de 0,5 mM a fim de induzir a expressão das proteínas.

Estudos cinéticos de tempo de indução com IPTG também foram realizados em dois tempos e temperaturas diferentes, sendo eles 1 hora a 25°C, 3 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos e então ressuspensas em tampão de amostra duas vezes concentrado (120 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS p/v, 20% glicerol v/v, 10% β-mercaptoetanol v/v, 0,02% azul de bromofenol p/v). Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos sendo analisadas em SDS-PAGE a 15% e corado com azul de Coomassie.

3.3.2 Teste de Solubilidade

Para testar a solubilidade da proteína recombinante foi utilizado 1 ml da cultura induzida. As culturas foram centrifugadas a 10.000 x rpm por 10 minutos e os sedimentos bacterianos ressuspensos em 1 ml de diferentes tampões de lise A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 mM β -Mercaptoetanol) contendo concentração de ureia que varia de 2 M a 8 M (sem ureia, 2 M, 4 M e 8 M).

A lise celular ocorreu por meio de choque térmico por ciclos de banho de nitrogênio seguido de banho maria (10 ciclos de 30 segundos em intervalos de 30 segundos entre os ciclos). Após a lise, os sobrenadantes e os precipitados foram analisados em SDS-PAGE a 15% corado por azul de Coomassie.

3.3.3 Expressão das Proteínas Recombinantes

Células de *E. coli* que obtiveram melhor desempenho na etapa 3.3.1 foram transformadas para expressão da proteína recombinante. Foi realizada uma indução em larga escala que ocorreu conforme a análise do melhor tempo e temperatura de indução, seguindo a mesma metodologia anteriormente citada. As células obtidas foram precipitadas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e foram ressuspensas em 20 ml de tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 mM β -Mercaptoetanol), contendo a concentração de ureia determinada pelo teste de solubilidade e, por fim, lisadas por seis pulsos de 30 segundos de ultrassom a 4°C.

3.3.4 Purificação da Proteína Recombinante

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando a coluna His-Trap FF de 1 ml no sistema AKTApriime plus (GE Healthcare). O lisado bacteriano contendo a proteína recombinante foi aplicado na coluna para a adesão da proteína recombinante. Para eliminar proteínas endógenas da bactéria, a coluna foi previamente lavada com 10 volumes da coluna de tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 mM 2-Mercaptoetanol). A eluição da proteína recombinantes foi realizada por meio de gradiente crescente de tampão B (tampão A + 500 mM de imidazol), partindo de 0% de concentração e atingindo 100% em 10 mL de corrida. As frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15%, corado com azul de Coomassie.

3.3.5 Dosagem do Antígeno Recombinante

Para estimativa da concentração da proteína recombinante, as densidades de suas bandas correspondentes a uma curva de diluição em géis corados com azul de Coomassie foram quantificadas por densitometria óptica pelo uso do programa iBright™ Analysis Software (iBA), e os dados apresentados como unidades arbitrárias da razão obtida entre o volume de pixels de cada banda de interesse pela quantidade de pixels detectada nas respectivas bandas com as concentrações conhecidas da curva de diluição de albumina sérica bovina (BSA).

3.4 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM IMUNOENSAIOS

3.4.1 Amostras

As amostras sorológicas envolvidas neste estudo fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM) do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz. A coleta das referidas amostras foi realizada de acordo com as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, a utilização da soroteca para a realização deste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz – PE, sob o número CAAE: 11083812.7.0000.5190. Foram analisadas 3 amostras de soro constituintes do grupo controle negativo, que foram coletadas de indivíduos que não relataram sintomas clínicos, e 10 amostras de soro positivas para leishmaniose tegumentar, testadas com pelo menos dois métodos de diagnóstico alternativos (pesquisa parasitológica direta e PCR).

3.4.2 ELISA

Para avaliação antigênica do antígeno recombinante, foi realizado ELISA indireto, utilizando soros humanos com LT. Antes da execução do teste, foi efetuada a padronização das concentrações de antígeno, soro e conjugado.

A quantificação das amostras sorológicas do estudo no ELISA foi realizada em microplacas de poliestireno com 96 poços (CRALPLAST CP®) revestidas com (100 µL/poço) do antígeno (0,6 µg/ml), diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6. A placa foi sensibilizada à 4°C por 16 horas. No dia posterior, as placas foram lavadas pela Lavadora de Microplacas PW40 da BIO-RAD, por duas vezes (500µL/poço) com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2. As placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de PBS, contendo 10% de leite desnatado (Molico, Nestlé) (PBS-L 10%) por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas, por duas vezes com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno-sorbitano, Sigma-Aldrich, St. USA) (PBS-T). As amostras de soros selecionadas foram diluídas 1:200 em PBS-T contendo 10% de leite desnatado (Molico, Nestlé) (PBS-TL 10%), e aplicadas em triplicatas (100µL/poço) por 1 hora à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS-T, os poços foram incubados com 100 µL anti-IgG cabra conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich, USA) na proporção de 1:5.000 com uso de solução PBS-TL 10%, por 1 hora à temperatura ambiente. A atividade enzimática foi revelada com 150 µL peróxido de hidrogênio 0,01% e orto-fenilenodiamina (OPD, da Sigma-Aldrich) em tampão fosfato-citrato pH 5,0, durante 30 minutos e a reação interrompida com 100 µl de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 2,5 M. As absorbâncias foram lidas com o filtro de 492 nm em um Benchmark Plus Microplate Manager 5.2 (BIO-RAD). Para cada amostra de soro/proteína, os ensaios foram realizados em triplicata com o resultado proveniente da média das três amostras subtraindo os valores dos poços em branco (apenas com PBS-TL). A medida das absorbâncias da amostra “padrão” controle negativo foi utilizada para o cálculo do *cut-off*.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados no programa Microsoft Office Professional Plus Excel 2021.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE E OBTENÇÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE

4.1.1. Extração De DNA Plasmidial Por Lise Alcalina

4.1.1.1 Lci9

O gene da Lci9 estava inserido em plasmídeo PRSET – que permite a fusão da proteína a ser induzida com uma sequência de seis histidinas na sua extremidade N-terminal. A sequência de poli-histidinas (6x-His) permite a purificação através de cromatografia de afinidade da proteína recombinante, além de permitir a detecção de sua expressão utilizando anticorpo comercial. Em uma primeira etapa o plasmídeo recombinante foi resgatado através de extração por kit comercial. Em seguida foi realizada uma digestão enzimática para verificação da presença do inserto. A análise do gel de agarose a 1% demonstrou a presença do inserto na altura de 2400 pb, altura correspondente ao gene da Lci9 evidenciado pela digestão enzimática pelas enzimas BamH I e Xho I (Figura 7).

Figura 7 – Confirmação de inserto da Lci9 por digestão enzimática

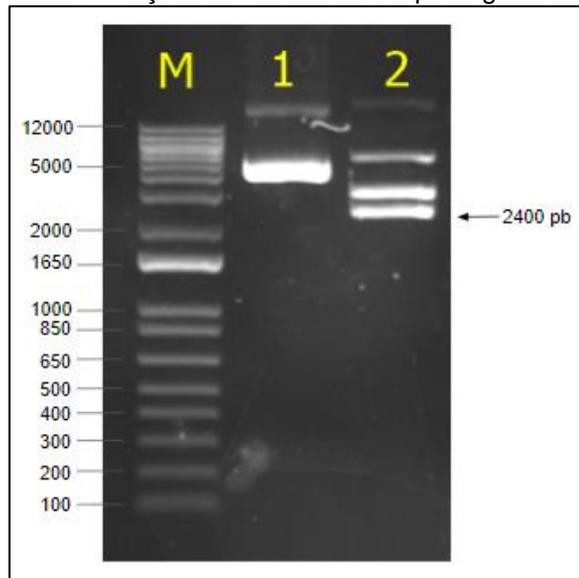


Figura 7. Análise eletroforética em gel de agarose 1%. Sendo M: marcador de peso molecular; 1: Extração do DNA da Lci9; 2: Digestão com enzimas de restrição BamHI/XhoI e a banda de 2400 pares de base (pb) confirmando a presença do inserto da Lci9.

4.1.1.1 Sequenciamento

Também foi realizada a confirmação do material genético através de sequenciamento. O alinhamento dos resultados obtidos no sequenciamento com a sequência de referência presente no banco de dados TritypDB (versão 8.1) (ASLETT et al., 2010).

4.2 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

4.2.1 Padronização para expressão em larga escala

Para obtenção de maior rendimento na expressão da proteína recombinante foi, a princípio, transformada em linhagens bacterianas *E. coli* (DE3): BL21, Rosetta,

pLysS. Foram observadas crescimento de colônias contendo o inserto da proteína recombinante Lci9 quando transformadas em pLysS. Para obtenção de maior rendimento na expressão das proteínas recombinantes, foram testadas diferente temperatura de indução por 0,5 mM de IPTG, sendo elas 25 e 30° C. A figura 8 mostra a melhor expressão da proteína quando induzida na temperatura de 30°C por 3 horas em pLysS.

Figura 8 – Padronização da expressão da Lci9

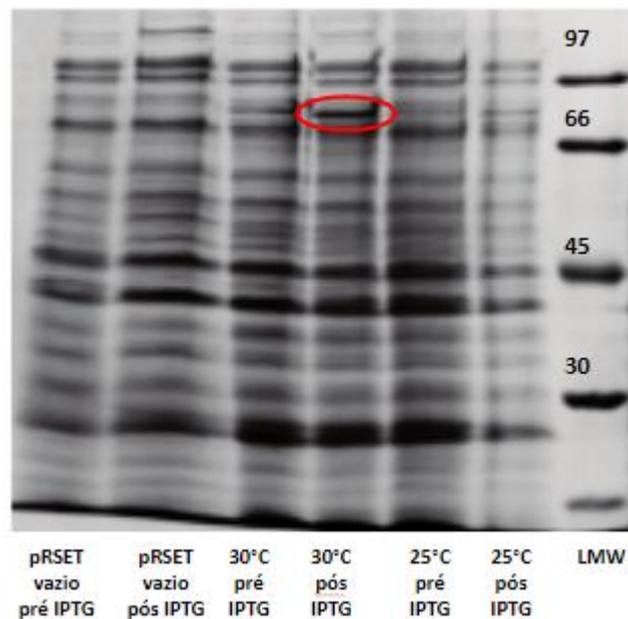


Figura 8: Gel SDS-PAGE 15%, mostrando a presença de banda correspondente a altura da Lci9 (71 kDa) mais forte (destacada em vermelho) quando induzida a 30° por 3 horas.

4.2.2 Teste De Solubilidade

O teste de solubilidade indicou que a Lci9 é uma proteína insolúvel, sendo necessária a adição de 2M de ureia durante o processo de purificação. Proteínas recombinantes, na forma insolúvel, formam agregados intracelulares, que dificultam sua purificação e consequente obtenção. Neste trabalho a purificação foi realizada com sucesso. No entanto, a adição de valores superiores de ureia não contribui na maior obtenção da proteína recombinante, não sendo visualizada a banda referente a

Lci9 no sobrenadante das corridas com esses valores de ureia, como apresentado na figura 9.

Figura 9 – Teste de solubilidade

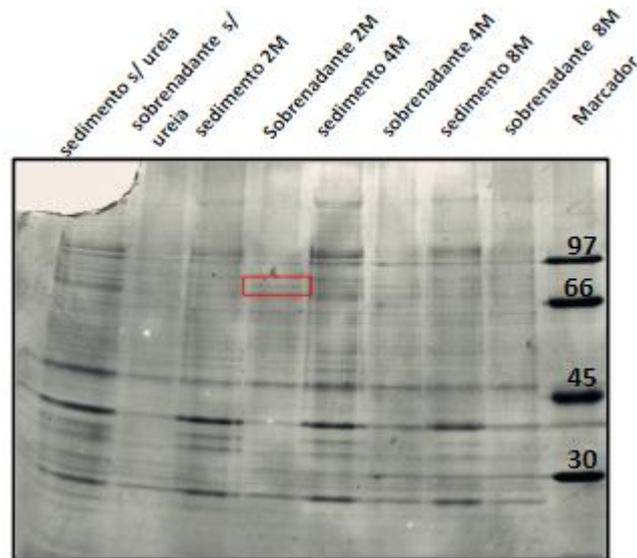
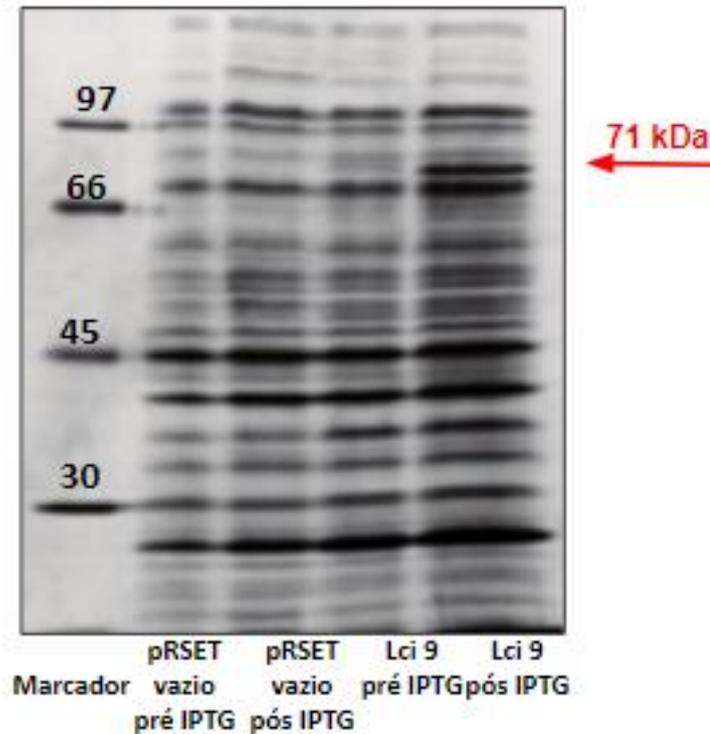


Figura 9. Teste de solubilidade. Gel SDS-PAGE 15%. Destacado em vermelho: banda correspondente a altura prevista da proteína recombinante Lci9 (71 kDa) aparecendo no sobrenadante quando ressuspendidas com tampão a 2M de ureia.

4.2.3. Expressão Da Proteína Recombinante em Larga Escala

Células de *E. coli* DE3 pLysS foram transformadas para a expressão da proteína recombinante Lci9 em maior escala. Foram realizadas induções em larga escala (dois litros) que ocorreram com uma concentração de IPTG à 0,5 mM por 3 horas a 30°C. As células obtidas foram precipitadas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e foram ressuspendas em 20 ml de tampão A contendo 2M ureia, e, por fim, lisadas por seis pulsos de 30 segundos de ultrassom a 4°C (Figura 10).

Figura 10 – Indução em larga escala da Lci9**Figura 10.** Gel SDS-PAGE 15%. Expressão em larga escala da proteína recombinante Lci9. A seta vermelha indica a altura da proteína (71kDa) visualizada após indução por IPTG.

4.2.4 Purificação Da Proteína Recombinante

O sobrenadante obtido após indução com 0,5 mM de IPTG a 30°C foi purificado por cromatografia de afinidade. O lisado bacteriano contendo a proteína recombinante foi aplicado na coluna para a adesão da proteína recombinante. As frações (F) obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS corado com azul de Coomassie (Figura 11). Conforme é observado na Figura 11, todas as frações purificadas apresentaram bandas inespecíficas correspondentes a proteínas constituintes do vetor de expressão bacteriano, não havendo assim um alto grau de pureza na purificação da proteína recombinante de interesse.

Figura 11 – Purificação da proteína recombinante

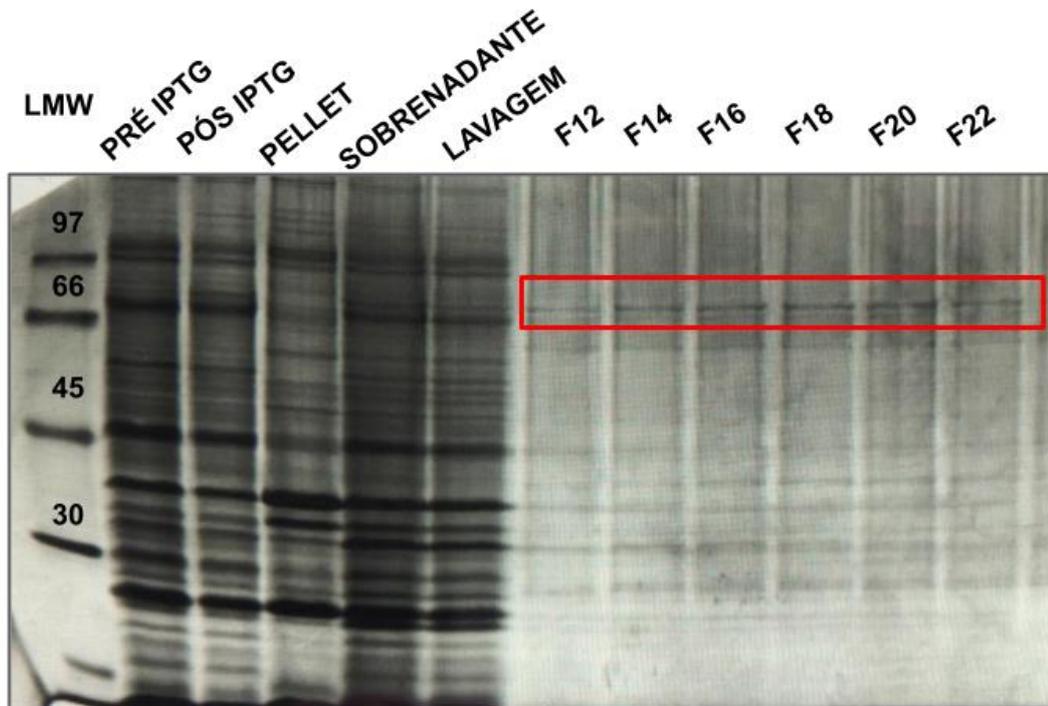


Figura 11. Análise em SDS-PAGE 15% corado por azul de Comassie da proteína recombinante Lci9 purificada por cromatografia de afinidade com aumento gradativo de imidazol. Sendo da esquerda para direita: LMW – marcador de peso molecular, pré IPTG –alíquota da cultura crescida antes do acréscimo do IPTG, PÓS IPTG –alíquota da cultura crescida após o acréscimo do IPTG, PELLET – alíquota do sedimento obtido após centrifugação depois do acréscimo do IPTG, SOBRENADANTE – alíquota do sobrenadante obtido após centrifugação depois do acréscimo do IPTG, LAVAGEM – alíquota obtida após do uso do tampão A, F12-F22 – número das frações obtidas após o uso do tampão B nas quais foram observadas a presença da Lci9 purificada. Destacado em vermelho é possível visualizar a proteína recombinante na altura 71 kDa.

4.2.5 Dosagem Do Antígeno Recombinante

A partir de 2 litros de expressão foram obtidos 12 ml contendo 23,20 μg da proteína recombinante Lci9 eluída com imidazol após diálise. A quantificação foi feita a partir da comparação com bandas de BSA com concentração conhecida, após corrida em gel SDS-PAGE (Figura 12). A quantidade obtida da proteína foi suficiente para a padronização dos testes de antigenicidade realizados com os soros humanos.

Figura 12 – Quantificação da Lci9 por comparação entre bandas

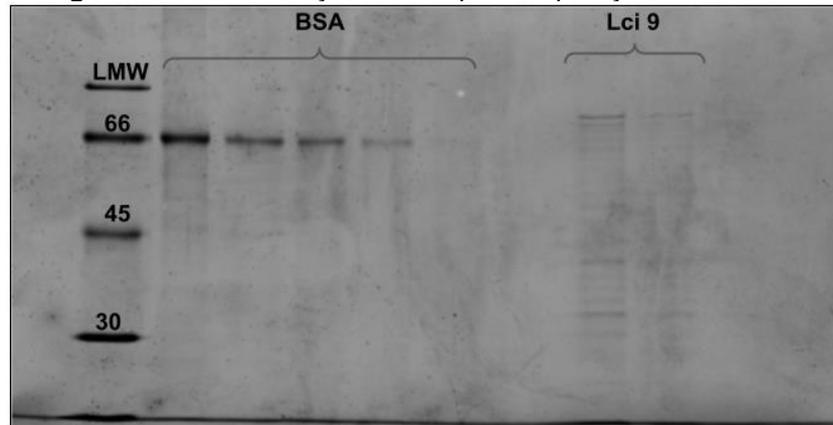


Figura 12. Quantificação da proteína Lci9 a partir da comparação entre as bandas de concentrações conhecidas de BSA e as bandas da Lci9.

4.3 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LCI9 EM IMUNOENSAIO INDIRETO ELISA

4.3.1. Amostras

Foram analisadas ao todos três amostras de soro constituintes do grupo controle negativo, que foram coletadas de indivíduos que não relataram sintomas clínicos, e dez amostras de soro positivas para leishmaniose tegumentar, testadas com pelo menos dois métodos de diagnóstico alternativos (pesquisa parasitológica direta e PCR).

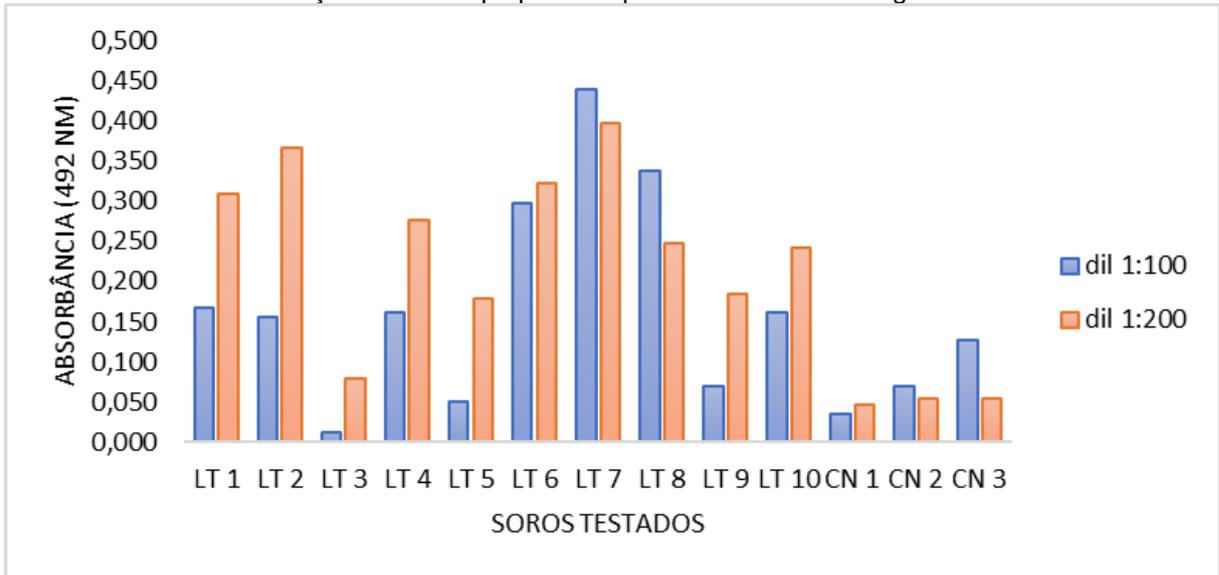
4.3.2 Padronização ELISA

4.3.2.1 Padronização do antígeno recombinante no ELISA

Foi efetuada a padronização das condições para o ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* utilizando antígeno recombinante Lci9, na qual foram estabelecidas o valor do antígeno, anticorpo primário (soro dos indivíduos) e anticorpo secundário (anti-IgG). Todas as amostras negativas utilizadas foram anteriormente testadas com o teste rápido Q5 para diagnóstico da LV, o qual utiliza uma proteína quimérica desenvolvida recentemente e que apresentou resultados promissores (sb de 89% para ELISA com amostras humanas positivas para leishmaniose visceral (LV), verificando a possibilidade de reação cruzada para a LV. Todas as etapas foram realizadas em triplicata e a leitura das amostras foi realizada no leitor de ELISA.

O resultado da padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*leishmania* utilizando a Lci9 em diferentes concentrações (100 ng, 200 ng, 400 ng e 600 ng) foi avaliado em dez amostras positivas e três amostras de indivíduos saudáveis. Para o controle da reação utilizamos como antígeno o extrato solúvel de *Leishmania braziliensis*.

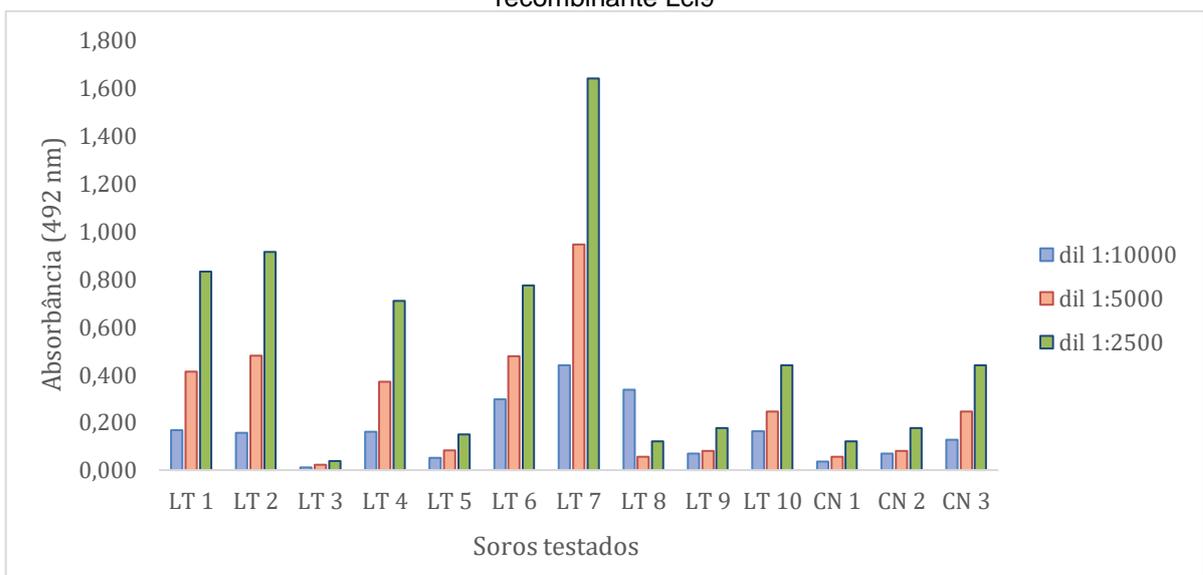
A padronização do anticorpo primário foi avaliada em diferentes diluições (1:100; 1:200). A diluição que apresentou melhores distinções entre positivos e negativos foi a diluição de 1:200.

Gráfico 1 – Padronização do anticorpo primário para ELISA com o antígeno recombinante Lci9

Legenda: LT - Indivíduos suspeitos para leishmaniose tegumentar; CN - Indivíduos saudáveis negativos para leishmaniose tegumentar e visceral

Fonte: a autora.

Para a padronização do anticorpo secundário anti-IgG foram avaliadas diferentes diluições (1:2500; 1:5000 e 1:10000). Foram utilizados as mesmas amostras e controles citados anteriormente. A diluição que apresentou melhores distinções entre positivos e negativos foi a diluição de 1:5000.

Gráfico 2 – Padronização do anticorpo secundário anti-IgG para o ELISA utilizando o antígeno recombinante Lci9

Legenda: LT - Indivíduos suspeitos para leishmaniose tegumentar; CN - Indivíduos saudáveis negativos para leishmaniose tegumentar e visceral

Fonte: A autora.

Dessa forma, foi observado que as seguintes condições permitiram a maior diferenciação entre os grupos positivos e negativos: antígeno para sensibilização da placa a 600 ng, amostras diluídas a 1:200 e anticorpo IgG conjugado diluído a 1:5000, sendo a solução de bloqueio e o diluente das amostras leites 10% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20.

4.3.2.2 Comportamento do antígeno recombinante no ELISA

Após padronização do antígeno com as condições descritas acima: 600 ng; soro 1:200 e anti-IgG 1:5000, e leitura dos resultados em um espectrofotômetro, foi obtido os valores de densidade óptica (do inglês *optical density* – OD) apresentados na tabela 1. A média corrigida consistiu na subtração da média de densidades ópticas de cada amostra avaliada, obtidas pelo leitor de ELISA, pelo valor da média dos brancos – poços contendo todos os reagentes utilizados no ensaio, mas sem adição do anticorpo primário.

Tabela 1 – Reatividade de soros em ensaio ELISA

Amostras	Densidade Óptica (OD)			Média	Média Corrigida
LT 1	0,469	0,473	0,469	0,470	0,412
LT 2	0,492	0,553	0,570	0,538	0,480
LT 3	0,083	0,078	0,078	0,080	0,022
LT 4	0,420	0,413	0,450	0,428	0,370
LT 5	0,130	0,141	0,153	0,141	0,083
LT 6	0,566	0,498	0,544	0,536	0,478
LT 7	1,010	1,009	0,992	1,004	0,946
CN 1	0,114	0,113	0,116	0,114	0,056
CN 2	0,139	0,131	0,144	0,138	0,080
CN 3	0,299	0,298	0,313	0,303	0,245
Branco	0,052	0,067	0,055	0,058	

Legenda: LT – Indica indivíduos com suspeita de LT. CN – Indica indivíduos saudáveis para a doença.

Fonte: A autora.

Como é possível observar, a Lci9 reagiu com 71,42% dos soros de indivíduos infectados e não reagiu consideravelmente com soros de pacientes saudáveis (Gráfico 1), mostrando reatividade apenas com uma amostra negativa.

Gráfico 3 – Reatividade de soros em ensaio de ELISA

Legenda: LT – indica indivíduos com suspeita de LT. CN – Indica indivíduos saudáveis para a doença.

Fonte: A autora.

5 DISCUSSÃO

A LT é considerada uma doença multifatorial, responsável pelo impacto psicológico e social devido às cicatrizes e lesões mutilantes que geram estigma e autodepreciação nos indivíduos acometidos. As medidas adotadas pelos órgãos públicos de saúde para o controle da doença têm-se mostrado ineficazes ao longo dos anos, de modo que a leishmaniose tegumentar se apresenta em elevada expansão em todo mundo, inclusive no Brasil. Isso ocorre, em parte, porque tais medidas são frequentemente descontinuadas e de difícil execução. Uma alternativa para o controle da LT é o diagnóstico precoce, que auxilia no tratamento rápido, evitando a cronificação da doença e a formação de lesões deformantes.

O desenvolvimento de testes diagnósticos simples, econômicos, não-invasivos e com alta sensibilidade para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar permanece um desafio. Por esta razão muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para a identificação de novos antígenos parasitários que possam ser utilizados no aperfeiçoamento das técnicas sorológicas de diagnóstico da leishmaniose tegumentar, estas que apresentam características benéficas e são de fácil aplicação na prática laboratorial (GUREL; TEKIN; UZUN, 2020).

As HSPs representam uma família conservada de proteínas intracelulares de pesos moleculares variados em células procarióticas e eucarióticas. Elas atuam como acompanhantes no dobramento de peptídeos e na translocação de proteínas para organelas, na prevenção da agregação de proteínas e na estabilização e degradação de proteínas. As HSPs mais abundantes são a HSP70 e HSP83, sendo expressas constitutivamente ao longo do ciclo de vida da *Leishmania*, aumentando a expressão no hospedeiro vertebrado devido à variação de temperatura e pH. As proteínas recombinantes e seus peptídeos sintéticos extraídos dessas proteínas₇ foram amplamente avaliados para o diagnóstico de LT apresentando desempenho promissor, com HSP83 apresentando sensibilidade acima de 90% e alta especificidade com poucas reações cruzadas (CELESTE; ANGEL; CASTRO; GIDLUND; GOTO, 2004).

As histonas são proteínas conservadas ligadas ao DNA que estabelecem a estrutura da cromatina em eucariotos. Várias funções biológicas foram descritas para

as histonas durante a infecção por *Leishmania* em hospedeiros susceptíveis. As histonas nucleossomais centrais de *Leishmania* foram propostas como patoantígenos intracelulares, visto que a resposta imunológica parece estar envolvida nos mecanismos patológicos da LV. Desta forma, esta família de proteínas tem sido extensivamente empregada em ELISA para LV humana e canina (LAKHAL et al, 2012). A presença de anticorpos contra rH2B de *L. peruana*, rH1 de *L. braziliensis* e rH2A, rH2B, rH3 e rH4 de *L. infantum* foram detectados em soros de indivíduos com LC ou ML. Carmelo e colaboradores (2002) demonstraram que o anticorpo contra a histona H1 era específico para o parasita sem reação cruzada com histonas humanas. No entanto, reatividade cruzada moderada foi observada em um painel de amostra composto por Lúpus Eritematoso Sistêmico LES e doença de Chagas.

A peroxidoxina, assim como a triparedoxina peroxidase, são peroxirredoxinas, uma família de enzimas antioxidantes. Estas proteínas estão diretamente associadas à proliferação celular, senescência, apoptose e ritmos circadianos e foram descritas no secretoma de *L. braziliensis* e a antigenicidade da triparedoxina peroxidase também foi avaliada para o diagnóstico de LV humana e canina. A peroxidoxina é a proteína-alvo identificada pelo teste rápido CL Detect (InBios International Inc.) para o diagnóstico de CL. Tem sido relatado desempenho variável para este teste rápido, de acordo com a região endêmica e, conseqüentemente, a espécie de *Leishmania* envolvida, com melhores resultados para infecções causadas por *L. tropica*, com sensibilidade variando de 65,4 a 73% e especificidade de 92 a 100% (SILVA et al., 2017). Esse teste, no entanto, ainda não foi avaliado no Brasil. Outras proteínas recombinantes, como citocromo c oxidase, fator de liberação de histamina IgE putativo, proibitina, fator de iniciação eucariótica 5a, peptídeo semelhante a catepsina L e pequena proteína miristoilada-3, bem como proteínas hipotéticas, foram avaliadas em estudos preliminares demonstrando potencial como candidatas para imunodiagnóstico de LT (ZANETTI et al., 2019).

Nas últimas décadas, um número crescente de candidatos a proteínas recombinantes tem sido proposto para substituir o antígeno bruto de *Leishmania* (SLA) para o diagnóstico sorológico da leishmaniose. Todavia, até o momento, poucas proteínas recombinantes foram implementadas em testes sorológicos para LT de forma satisfatória (PAGNIEZ et al., 2023). Levando isso em consideração, este estudo se propôs a testar a viabilidade do uso de um antígeno recombinante promissor,

derivado de *L. infantum* para o sorodiagnóstico de LT, visando um desempenho superior ao da SLA. Embora essa proteína seja derivada de uma espécie de *Leishmania* diferente de *L. (V.) braziliensis*, principal representante causadora de LT, essa proteína pertence à família conservada entre as várias espécies de *Leishmania*, possibilitando seu uso para o diagnóstico sorológico de LT.

O gene da Lci9 codifica a expressão de uma proteína, que apresenta localização citoplasmática em todas as fases de evolução do parasita. Além disso, a proteína recombinante escolhida apresenta duas regiões contendo motivos repetitivos. Alguns trabalhos evidenciam que proteínas contendo repetições em tandem são capazes de gerar sozinhas resposta de células B (células produtoras de anticorpos) (KAMP et al., 1987; REEDER e BROWN, 1996; GOTO et al., 2006a) e provavelmente por esta razão, anticorpos contra proteínas com domínios repetitivos são tão abundantes em triagens sorológicas (KOTERA et al., 1994; VOS, et.al. 2000; HINTON et.al. 2008).

O sistema utilizado para expressão da proteína recombinante foi a bactéria *E. coli* devido ao baixo custo e facilidade de cultivo em alta densidade, possuindo também uma genética bem conhecida e um grande número de ferramentas disponíveis, como por exemplo, linhagens modificadas (MORTENSEN, 2005), como a utilizada nesse estudo, a BL21(DE3) pLysS. Vários trabalhos voltados para diagnósticos da leishmaniose utilizam a pLysS como sistema de expressão de proteínas (RAMOS et al., 2021; JAMEIE et al., 2021; DIAS et al., 2023) e obtiveram bons resultados. O plasmídeo utilizado neste trabalho, pRSETA possui características apropriadas para a produção de proteína recombinante em células procarióticas, como por exemplo a presença de uma forte região promotora para expressão proteica (SCHOEPFER, 1993).

Para investigar o efeito de diferentes temperaturas pós-indução e o tempo de incubação pós-indução no rendimento da proteína recombinante, duas temperaturas de incubação (25°C e 30°C) foram avaliadas em diferentes tempos de incubação (1 e 3h). Vários estudos sugeriram que a temperatura pós-indução, bem como o tempo de incubação, pode afetar o rendimento da produção de proteínas recombinantes (SAÏDA, 2007; CASPETA et al., 2009; KHOW; SUNTRARACHUN, 2012). De acordo com nossos resultados, o aumento da temperatura para 30°C juntamente com o tempo de incubação de 3h aumentou o rendimento da proteína. Esse resultado

convergiu com o apresentado por Nascimento (2009), que observou melhor rendimento da Lci9 quando induzida por IPTG a 25°C por 1 hora.

A avaliação da solubilidade da proteína recombinante em diferentes concentrações de ureia foi uma etapa importante, visto que em estudos anteriores de Nascimento (2009) e Magalhães e colaboradores (2017) havia sido relatado o uso de tampões contendo 8 M de ureia para solubilização da proteína recombinante, concentração muito alta de solvente. A utilização de ureia para utilizado desde a década de 60, após a demonstração por Anfinsen (1968) da solubilização reversível de proteínas em soluções com ureia, por ser um material econômico e compatível com avaliação em gel SDS-Page. Contudo, SUN e colaboradores (2014) relataram que a solubilização de proteínas por ureia, pode causar carbamilação de proteínas, adição não enzimática de carbamoil (-CONH₂) à proteína ou grupos de aminoácidos funcionais de ácido isociânico, provocando interferências na obtenção de proteínas durante a purificação. Dessa forma, a demonstração da solubilidade da Lci9 em tampões contendo uma menor concentração de ureia (2 M) foi um achado importante para a obtenção da proteína purificada.

Os métodos cromatográficos mais utilizados para o isolamento de proteínas são cromatografias de exclusão por tamanho, troca iônica e afinidade (SALLEH et al., 2022). Neste trabalho, o método aplicado para isolar a proteína recombinante foi a cromatografia de afinidade em resina de níquel através da coluna HisTrap. Durante a purificação da proteína recombinante foi observada que a proteína recombinante Lci9 apresentou certo grau de degradação mesmo após a utilização de inibidores de proteases como também após várias modificações no protocolo (adição de racional de ureia), como já vinha sido observado por Nascimento (2009). Acreditamos que essa degradação ocorra devido aos motivos repetitivos desta proteína, que apresenta duas frações repetições. Outra explicação possível seria o esgotamento dos códons das bactérias visto a repetitividade das proteínas descrito por Kroll e colaboradores (1993). Apesar deste problema metodológico, foi possível analisar a antigenicidade das proteínas recombinantes em teste de ELISA indireto.

Na avaliação da aplicabilidade da utilização da Lci9 por ELISA, foi observado que o antígeno conseguiu detectar como positivo para LT indivíduos sintomáticos e distingui-los de indivíduos saudáveis. Apesar da proteína Lci9 já ter sido descrita anteriormente como um antígeno promissor para o diagnóstico sorológico da LV

(MAGALHÃES, 2017), sua avaliação frente a um painel de soros de indivíduos com LT não havia sido realizada. Apesar do desempenho desta proteína recombinante ter se mostrado equivalente ao de outros antígenos recombinantes já testados, um aumento de sensibilidade pode vir a ser observado com a combinação da Lci9 com outras proteínas recombinantes, através de uma otimização com múltiplos antígenos.

Portanto, a Lci9 ou, possivelmente, combinações com diferentes proteínas recombinantes merecem uma avaliação mais aprofundada como uma valiosa ferramenta diagnóstica para o diagnóstico sorológico de LT. A reação cruzada entre *Leishmania* e outras doenças causadas por determinantes antigênicos comuns dificulta o diagnóstico específico da LT, especialmente em regiões onde várias doenças parasitárias são endêmicas. Uma limitação do estudo foi a não testagem da proteína recombinante contra um painel de soros de indivíduos que apresentam doenças de diagnóstico diferencial para LT, como doença de Chagas, Lupus Eritematoso Sistêmico, Hanseníase e Tuberculose.

Dessa forma, a utilização da Lci9 no ELISA mostrou que essa nova proteína recombinante reagiu com 71,42% das amostras positivas testadas durante a padronização e não reagiu com amostras negativas quando comparado os valores de reatividade das amostras positivas. No entanto, sabemos que é necessário realizar ensaios com um número maior de amostras de indivíduos com suspeita para LT e saudáveis para doença, para que dessa forma possamos concretizar a eficiência da Lci9 no diagnóstico da leishmaniose tegumentar. Portanto, com base nos resultados obtidos neste estudo, acreditamos que a Lci9 pode ser empregada em uma nova abordagem para o desenvolvimento de proteínas quiméricas recombinantes com potencial para o diagnóstico sorológico preciso da LT quando comparado com os métodos utilizados na rotina laboratorial.

6 CONCLUSÃO

- A proteína recombinante Lci9 apresentou reatividade com amostras positivas para LT no ELISA;
- São necessários mais estudos com Lci9 de forma que possa ser avaliadas suas aplicabilidades junto a outros antígenos recombinantes;
- O presente trabalho apresenta dados que podem contribuir para a construção de uma nova proteína quimérica para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I. et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601–618, jul. 2021.
- ABDELADHIM, M. et al. Human Cellular Immune Response to the Saliva of *Phlebotomus papatasi* Is Mediated by IL-10-Producing CD8⁺ T Cells and Th1-Polarized CD4⁺ Lymphocytes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, p. e1345, 4 out. 2011.
- ALBUQUERQUE, L. W. N. et al. New immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years: Technological Prospecting. **Acta Tropica**, p. 106903, mar. 2023.
- ANFINSEN, Christian B.; HABER, Edgar. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 5, p. 1361-1363, 1961.
- ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 101–117, mar. 2019.
- BARROS, Nicolas; VASQUEZ, Nestor; WOLL, Fernando; SANCHEZ, Cesar; VALENCIA, Braulio; LLANOS-CUENTAS, Alejandro; WHITE JUNIOR, A. Clinton; MONTES, Martin. Regulatory T-Cell Dynamics in Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 753-758, 7 mar. 2018.
- BARROSO-FREITAS, A.P.T. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 383-389, abr. 2009.
- BATES, Paul A.. Revising *Leishmania*'s life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529-530, 24 abr. 2018.
- BRAZ, L. M. A. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 2019.
- BEST, I. et al. IFN- γ Response Is Associated to Time Exposure Among Asymptomatic Immune Responders That Visited American Tegumentary

Leishmaniasis Endemic Areas in Peru. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 21 ago. 2018.

BOGGILD, Andrea K.; VELAND, Nicolas; MIRANDA-VERASTEGUI, Cesar; RAMOS, Ana P.; VALENCIA, Braulio M.; LLANOS-CUENTAS, Alejandro; LOW, Donald E.; AREVALO, Jorge; ESPINOSA, Diego. Clinical and Demographic Stratification of Test Performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for american cutaneous leishmaniasis. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 345-350, 5 ago. 2010.

BRITO, N. C.; RABELLO, A.; COTA, G. F. Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184777, 19 set. 2017.

BRITO, Rory Cristiane Fortes de et al. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 104, n. 19, p. 8105-8116, 26 ago. 2020.

CASPETA, Luis; FLORES, Noemí; PÉREZ, Néstor O.; BOLÍVAR, Francisco; RAMÍREZ, Octavio T.. The effect of heating rate on Escherichia coli metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 102, n. 2, p. 468-482, 1 fev. 2009.

CARVALHO, S. H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 380–391, 19 abr. 2019.

CELESTE, B.J.; ANGEL, S.O.; CASTRO, L.G.M.; GIDLUND, M.; GOTO, H.. Leishmania infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 37, n. 11, p. 1591-1593, nov. 2004.

CHRISTENSEN, S. M. et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007152, 7 mar. 2019.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Recombinant Proteins. Em: **Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 335–363.

CUNHA, C. F. et al. Contribution of *Leishmania braziliensis* antigen-specific CD4⁺ T, CD8⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺NKT cells in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis patients: Cytotoxic, activation and exhaustion profiles. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0229400, 23 mar. 2020.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Chemokines in Leishmaniasis: Map of cell movements highlights the landscape of infection and pathogenesis. **Cytokine**, v. 147, p. 155339, nov. 2021.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 17 abr. 2015.

DIAS, Daniel Silva; MACHADO, Juliana Martins; RIBEIRO, Patrícia Aparecida Fernandes; MACHADO, Amanda Sanchez; RAMOS, Fernanda Fonseca; NOGUEIRA, Lais Moreira; GONÇALVES, Ana Alice Maia; RAMOS, Luana de Sousa; GANDRA, Isadora Braga; COUTINHO, Flaviane Silva. RMELEISH: a novel recombinant multiepitope-based protein applied to the serodiagnosis of both canine and human visceral leishmaniasis. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 302, 11 fev. 2023.

FREIRE, M. L. et al. Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 16, n. 5, p. e0251956, 27 maio 2021.

GABRIEL, Á. et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1–16, 1 dez. 2019.

GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, 2 dez. 2018.

GOMES, A. H. S. et al. American cutaneous leishmaniasis: In situ immune response of patients with recent and late lesions. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 4, p. e12423, abr. 2017.

GOMES, Ciro Martins; PAULA, Natália Aparecida de; MORAIS, Orlando Oliveira de; SOARES, Killarney Ataíde; ROSELINO, Ana Maria; SAMPAIO, Raimunda Nonata Ribeiro. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701-709, set. 2014.

GOMES, Maria Eduarda Martins Santos Alves; FERREIRA, Erica Pontes Pereira. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO BRASIL: análise de 2010

a 2019. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 5, p. 1086-1096, 31 maio 2022.

GUREL, M. S.; TEKIN, B.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. **Clinics in Dermatology**, v. 38, n. 2, p. 140–151, mar. 2020.

HOTEZ, P. J. The rise of leishmaniasis in the twenty-first century. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 9, p. 421–422, 1 set. 2018.

IBARRA-MENESES, A. V. et al. Identification of asymptomatic Leishmania infections: a scoping review. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 5, 5 dez. 2022.

KROLL, David J.; ABDEL-HAFIZ, Hany Abdel-Malek; MARCELL, Tere; SIMPSON, Sean; CHEN, Chang-You; GUTIERREZ-HARTMANN, Arthur;

LUSTBADER, Joyce W.; HOEFFLER, James P. A Multifunctional Prokaryotic Protein Expression System: overproduction, affinity purification, and selective detection. **Dna And Cell Biology**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 441-453, jun. 1993.

LAKHAL, Sami; MEKKI, Salima; BEN-ABDA, Imène; MOUSLI, Mohamed; AMRI, Fethi; AOUN, Karim; BOURATBINE, Aïda. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Crude Leishmania Histone Proteins for Serodiagnosis of Human Infantile Visceral Leishmaniasis. **Clinical And Vaccine Immunology**, v. 19, n. 9, p. 1487-1491, set. 2012.

LÉVÊQUE, M. F. et al. Place of Serology in the Diagnosis of Zoonotic Leishmaniasis With a Focus on Visceral Leishmaniasis Due to Leishmania infantum. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 25 fev. 2020.

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9–16, fev. 2019.

MANN, Sarah; FRASCA, Katherine; SCHERRER, Sara; HENAO-MARTÍNEZ, Andrés F.; NEWMAN, Sabrina; RAMANAN, Poornima; A SUAREZ, José. A Review of Leishmaniasis: current knowledge and future directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121-132, 17 mar. 2021.

MELO, M. G. N. DE et al. Clinical and epidemiological profiles of patients with American cutaneous leishmaniasis from the states of Pernambuco and Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

MENDES, A. P. O. et al. American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L. (V.) braziliensis* fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1015, 29 dez. 2019.

MESA, L. E. et al. Test accuracy of polymerase chain reaction methods against conventional diagnostic techniques for Cutaneous Leishmaniasis (CL) in patients with clinical or epidemiological suspicion of CL: Systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007981, 21 jan. 2020.

MESSLINGER, H. et al. Monocyte-Derived Signals Activate Human Natural Killer Cells in Response to Leishmania Parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 24 jan. 2018.

MOREIRA, O. C.; YADON, Z. E.; CUPOLILLO, E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. **Acta Tropica**, v. 184, p. 29–37, ago. 2018.

OLIVEIRA, D. K. F. DE et al. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES DERMOTRÓPICAS E VISCEROTRÓPICAS. **Revista Unimontes Científica**, v. 23, n. 2, p. 1–14, 3 set. 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais**. [s.l.] Pan American Health Organization, 2021.

OUALHA, R. et al. Infection of Human Neutrophils With *Leishmania infantum* or *Leishmania major* Strains Triggers Activation and Differential Cytokines Release. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 10 maio 2019.

PAGNIEZ, J. et al. A systematic review of peptide-based serological tests for the diagnosis of leishmaniasis. **Parasite**, v. 30, p. 10, 31 mar. 2023.

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

PEREIRA, L. DE O. R. et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 57, p. 132–137, abr. 2017.

PINEDA, Juan A.; MACÍAS, Juan; MORILLAS, Francisco; FERNÁNDEZ-OCHOA, Jesús; CARA, Juan; LAROSA, Rafael de; MARTÍN-SÁNCHEZ, Joaquina; GONZÁLEZ, Manuel; GARCÍA-BRIONES, Emilio; DELGADO, Juan. False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluent. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 95, n. 2, p. 173-174, mar. 2001.

RAMOS, Rhaíssa E. M.; SANTOS, Wagner J. T.; MAGALHÃES, Franklin B.; DINIZ, George T. N.; COSTA, Carlos H. N.; MELO NETO, Osvaldo P. de; MEDEIROS, Zulma M.; REIS, Christian R. S.. Assessment of a recombinant protein from *Leishmania infantum* as a novel tool for Visceral Leishmaniasis (VL) diagnosis in VL/HIV co-infection cases. **Plos One**, v. 16, n. 5, p. 1-16, 17 maio 2021.

RANGEL, E. F. et al. Sand Fly Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. Em: **Brazilian Sand Flies**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 341–380.

REIMÃO, J. Q. et al. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, 22 out. 2020.

SALLEH, Mohd Hairul Mohd; PELI, Aida Fitri; NGALIMAT, Mohamad Syazwan; SIM, Kwa Jia. A Mini Literature Review on Current Advancements in Protein Purification Techniques. **iecbm 2022**, v. 2, n. 1, p. 1-19, 9 nov. 2022.

SAMPAIO, R. N. R. et al. Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 5, p. 602–604, set. 2021.

SAUTER, I. P. et al. TLR9/MyD88/TRIF signaling activates host immune inhibitory CD200 in *Leishmania* infection. **JCI Insight**, v. 4, n. 10, 16 maio 2019.

SCORZA, B.; CARVALHO, E.; WILSON, M. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 18 jun. 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 18 set. 2016.

SERRANO-COLL, H. et al. Innate immune response: ally or enemy in cutaneous leishmaniasis? **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 5, 8 jun. 2021.

SCHOEPFER, Ralf. The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. **Gene**, [S.L.], v. 124, n. 1, p. 83-85, fev. 1993.

SILVA, Gayani de; SOMARATNE, Vijani; SENARATNE, Sujai; VIPULADASA, Manuja; WICKREMASINGHE, Rajitha; WICKREMASINGHE, Renu; RANASINGHE, Shalindra. Efficacy of a new rapid diagnostic test kit to diagnose Sri Lankan cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 11, p. 1-8, 14 nov. 2017.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253–272, 16 jun. 2020.

THOMAZ, C. et al. Comparison of parasite load by qPCR and histopathological changes of inner and outer edge of ulcerated cutaneous lesions of cutaneous leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0243978, 21 jan. 2021.

TIBÚRCIO, R. et al. Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 22 fev. 2019.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 26 maio 2017.

VASCONCELOS DOS SANTOS, T. et al. Ecological aspects of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) and the transmission of American cutaneous leishmaniasis agents in an Amazonian/ Guianan bordering area. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 612, 29 dez. 2018.

VASCONCELOS, J. M. et al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.

VOLPEDO, G. et al. Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 8 jun. 2021.

WYREPKOWSKI, C. D. C. et al. Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 8, p. e3352, 26 jun. 2020.

REIMÃO, J. Q. et al. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, 22 out. 2020.

SAÏDA, Fakhri. Overview on the Expression of Toxic Gene Products in *Escherichia coli*. **Current Protocols In Protein Science**, v. 50, n. 1, p. 1-16, nov. 2007.

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, 12 jun. 2013.

SUÁREZ, Milagros et al. Quantification of *Leishmania* (*Viannia*) Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 1-19, 23 jul. 2015.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253–272, 16 jun. 2020.

THOMAZ, C. et al. Comparison of parasite load by qPCR and histopathological changes of inner and outer edge of ulcerated cutaneous lesions of cutaneous leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0243978, 21 jan. 2021.

VASCONCELOS, J. M. et al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.

ZANETTI, Andernice dos Santos; SATO, Camila Massae; LONGHI, Fabiana Gulin; FERREIRA, Silvana Margarida Benevides; ESPINOSA, Omar Ariel. 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**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 1-9, ago. 2019.