



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ALLANA MARIA DE SOUZA PEREIRA

AVALIAÇÃO DE IMUNOENSAIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR UTILIZANDO PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS
PREDITAS *in silico*.

RECIFE, 2021

ALLANA MARIA DE SOUZA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DE IMUNOENSAIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR UTILIZANDO PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS PREDITAS *in silico*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Dra. Valéria Pereira Hernandez

Coorientadoras: Dra. Danielle Maria Nascimento Moura e Dra. Beatriz Coutinho de Oliveira

RECIFE-PE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Pereira, Allana Maria de Souza

Avaliação de imunossaios para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar utilizando peptídeos e proteínas preditas *in silico* / Allana Maria de Souza Pereira. - 2021.

147 f. : il.

Orientadora: Dra. Valéria Pereira Hernandes.

Coorientadora: Dra. Danielle Maria Nascimento Moura.

Coorientadora: Dra. Beatriz Coutinho de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Leishmaniose. 2. Imunologia. 3. Bioinformática. I. Hernandes, Valéria Pereira (orientadora). II. Moura, Danielle Maria do Nascimento (coorientadora). III. Oliveira, Beatriz Coutinho de (coorientadora) IV. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-075

ALLANA MARIA DE SOUZA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DE IMUNOENSAIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR UTILIZANDO PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS PREDITAS *in silico*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
Membro Titular (Examinadora Interna)

Dra. Aline Caroline da Silva Santos
Membro Titular (Examinadora Externa)

Prof. Dr. Rafael de Freitas e Silva
Membro Titular (Examinador Externo)

Recife – PE

2021

Dedico aos meus pais e minha irmã
Lorena.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Ele que me sustentou durante todo o caminho, me dando forças para vencer todos os desafios. Sei que cheguei até aqui porque Ele preparou tudo da melhor maneira possível, e por isso eu entrego toda a minha vida nas mãos Dele.

Aos meus pais e minha irmã Lorena, vocês são a minha base. Todos os dias me apoiando, sonhando e lutando comigo. Sou muito grata por Deus ter escolhido vocês para mim. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, por nunca medirem esforços para me ajudar e apoiar. Sem vocês a minha vida não teria sentido.

Ao meu avô (*in memoriam* Inácio), sei que o senhor está muito orgulhoso por mais essa conquista na minha vida. Saudades imensas!

Às minhas avós Lúcia e Edite e todos os meus tios e tias, primos e primas. Obrigada por me apoiarem.

À minha amiga desde sempre Adri. Obrigada por todas as horas intermináveis de conversas sobre todos os tópicos do mundo. Você é luz!

Às minhas amigas Carol e Nathalia, eu amo vocês demais. Fomos a força uma da outra em momentos não tão bons na nossa vida e hoje agradeço por ter passado por tudo isso ao lado de vocês. E mesmo que a gente só se encontre em aniversários e nas viagens de fim de ano sei que vocês estão sempre presentes, amo vocês e obrigada.

Aos meus biólogos favoritos no mundo inteiro (Gabi, Gh, Igor, Yasmin e Aline). Só tenho a agradecer por todo apoio sempre. Não tem um dia que a gente fica sem se falar, mesmo que seja só pra brigar das polêmicas da internet e fofocar. Esses últimos anos foram incríveis, muitas experiências compartilhadas. Amo vocês e obrigada por todo apoio e força que vocês me dão diariamente, minha família.

À minha amiga/gêmea Gabi por me conhecer e me apoiar tanto ao longo desses anos tão intensos. Nossa amizade só cresceu, se fortaleceu e encontrei em você alguém que partilha dos mesmos sonhos, amor por tubarões e sei que vamos conhecer esse mundo todo ainda. Amo você.

À minha orientadora Valéria, muito obrigada por ser essa pessoa incrível que Deus colocou em minha vida. Sempre cuidando, ajudando e me orientando da melhor maneira. Sou muito grata por fazer parte do seu grupo.

Agradeço também a minha co-orientadora Beatriz, que me ensinou tanto ao longo desses anos. Você sempre é muito parceira, sempre me ajudando nessa loucura que é a nossa vida. Obrigada por todas as horas no laboratório, fazendo os experimentos e ainda ouvindo todos os meus desesperos. Você se tornou uma grande amiga e desejo tudo de maravilhoso para a sua vida sempre.

À minha co-orientadora Dra Danielle, por todos os ensinamentos e incentivos.

À todos os meus companheiros de laboratório do IAM: Marton, Lucas, Elis, Catarina, Vanessa, Carol, Mayara, Aline, Cibele, Ester, Karina e Carla, é sempre muito bom trabalhar com todos vocês.

Um agradecimento em especial para os meus amigos Marton, Lucas e Elis. Vocês foram um presente na minha vida esses anos. Obrigada por todo apoio, conversas e risadas. Meus dias sempre ficam melhores com vocês.

À minha amiga de intercâmbio Vanessa Nunes. Deus me presenteou com você e eu sou muito grata por isso. Obrigada por sempre ouvir os meus milhões de áudios amiga.

À Dra Edi, por toda colaboração junto ao Serviço de Referência em Leishmaniose e por todos os conselhos e ensinamentos.

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

À todos os professores da graduação da UFRPE, por todo conhecimento e experiências sobre a Biologia passada ao longo dos anos, que fizeram o amor por essa área só aumentar.

À todos aqueles que não foram citados, mas contribuíram para esse trabalho acontecer. Muito obrigada.

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença reemergente e negligenciada que representa um grave problema de saúde pública mundial. Nas Américas, o Brasil apresenta a maior prevalência de casos, onde Pernambuco é um dos estados endêmicos para a doença. Considera-se que para o controle efetivo é necessário diagnosticar os casos precocemente e tratá-los, além de controlar vetores e aplicar vacinas; porém, isto ainda não é uma realidade. Um ponto crucial dentro dessas limitações é a ausência de um método padrão-ouro para o diagnóstico, e os utilizados variam na precisão dos resultados. Nesse cenário, uma possível solução é a expansão das aplicações das ferramentas de bioinformática, utilizadas como valiosas estratégias para a obtenção de antígenos específicos de agentes infecciosos com o intuito de aprimorar o desempenho dos métodos existentes. Em trabalhos anteriores, nosso grupo fez uso de ferramentas *in silico* e obtendo-se duas proteínas recombinantes (1140 e 0750) com potencial de diagnóstico; dez sequências peptídicas (organizadas nos pools P1 e P2); e duas proteínas quiméricas com potencial vacinal. Assim, o objetivo do presente trabalho foi otimizar metodologias sorológicas convencionais, incorporando o uso das moléculas obtidas *in silico*, descritas anteriormente. Para tal, amostras de soro de pacientes portadores de LT ativa (N=30), Leishmaniose Visceral (LV) (N=30 e Psoríase (PSO) (N=22), bem como amostras de indivíduos saudáveis (N=10), foram utilizadas nos testes. Proteínas e peptídeos foram avaliados nos ensaios do teste de ELISA e Citometria de Fluxo (CF). Como primeiro resultado dos ensaios de CF, o acoplamento das proteínas (0750,1140 e PADRE), individualmente, com esferas de poliestireno foi obtido com êxito, avaliado através do controle do acoplamento e controle do conjugado. Entretanto, quando as moléculas foram testadas com amostras de pacientes de LT ativa e controles saudáveis, não foi possível diferenciar ambos os grupos. Os testes de ELISA foram realizados com cada uma das moléculas com o intuito de avaliar o desempenho na identificação de portadores de LT e no diagnóstico diferencial com LV e PSO. Dos resultados obtidos com as proteínas recombinantes, a proteína 1140 apresentou a melhor sensibilidade (90%) para detecção de portadores de LT. Esta proteína é derivada de regiões com maior número de epítomos específicos de célula B no proteoma de *L. (V.) braziliensis*. Em relação aos dois pools de peptídeos, o P1 demonstrou a melhor sensibilidade quando comparado ao P2. Este resultado pode ser baseado no fato de que os peptídeos que compõem o P2 foram descritos anteriormente por apresentar um perfil de resposta inespecífico, onde estimularam células de pacientes de LT e controle. Em relação aos níveis de reações cruzadas com LV e PSO, um resultado interessante foi observado com a 0750 (86,67%), que apresentou um maior índice de

especificidade para LT, em comparação com a 1140 (50%). Essas proteínas são provenientes de regiões conservadas entre as espécies de *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum*, explicando a possibilidade de reação com as amostras de LV da 1140. O mesmo fato pode explicar a presença de reatividade de ambos os pools com as amostras de LV; porém, também foi observada reatividade com as amostras de PSO. Pacientes portadores dessa doença apresentam um quadro de inflamação com resposta celular intensa, possibilitando a ligação inespecífica dessas células com os anticorpos gerando resultados falso-positivos. Por fim, de acordo com os resultados obtidos, a proteína recombinante 1140 e o pool de peptídeos P1 demonstraram resultados promissores para um diagnóstico sorológico eficaz da LT.

Palavras-chaves: Imunologia. Citometria de Fluxo. Bioinformática. ELISA. Anticorpos; Resposta humoral.

ABSTRACT

Cutaneous Leishmaniasis (CL) is a re-emerging and neglected disease that represents a serious global public health problem. Brazil has the highest prevalence of cases in the Americas, where Pernambuco is one of the endemic States for the disease. Control measures include an early diagnosis, treatment of infected patients, vector control and vaccines. However, these actions still have major pitfalls. A crucial point within these limitations is the absence of a gold standard method for the diagnosis, and the ones that are used vary in terms of accuracy. Therefore, a possible solution would be the expansion of bioinformatics tools and its applications that have been used as a valuable strategy for obtaining specific antigens from different pathogens in order to improve the performance of the existing methods. In previous studies from our group using *in silico* tools, it was possible to identify two recombinant proteins (0750 and 1140) for diagnosis; ten peptide sequences (organized in pools P1 and P2) and two chimeric proteins with vaccine potential. Thus, the aim of this study was to optimize conventional serological methodologies, incorporating the use of the molecules predicted *in silico* described above. Serum samples from patients with active CL (N=30), Visceral Leishmaniasis (VL) (N=30), and Psoriasis (PSO) (N=22), as well as samples of healthy individuals (N=10), were used. Proteins and peptides were evaluated by ELISA and Flow Cytometry (FC) assays. Regarding FC results, all the proteins (0750, 1140 and PADRE) were successfully bound with polystyrene beads, as observed through the binding and conjugate internal controls. However, when the molecules were tested with samples from active CL patients and healthy controls, the antibody titers could not be distinguished. ELISA tests were performed with each of the molecules in order to evaluate their performance in identifying CL patients and in differential diagnosis with VL and PSO. From the results obtained among the recombinant proteins, the one with the best sensitivity (90%) for detection of CL patients was the “1140” protein. This protein is derived from regions with higher numbers of B-cell- specific epitopes in the proteome of *L. (V.) braziliensis*. Regarding the peptide pools, P1 showed the best sensitivity when compared to P2. This result may be based on the fact that the P2 peptides have been previously described to have a nonspecific response profile, where they stimulated cells from both CL and control individuals. Regarding cross-reactions with VL and PSO, an interesting result was observed with 0750 (86,67%), which showed a higher specificity index compared to 1140 (50%). These proteins are from conserved regions between *L. (V.) braziliensis* and *L. infantum* species, explaining the possibility of reaction with the VL samples observed with 1140. This may also explain the presence of reactivity of both pools with the VL samples; however, the highest reactivity was observed with PSO

samples. Patients with this disease show intense inflammation with high cellular response, enabling the nonspecific binding of these cells with the antibodies, generating false-positive results. According to the obtained results, the recombinant protein 1140 and the P1 peptide pool have both demonstrated promising results for an effective serological diagnosis of CL.

Keywords: Immunology. Flow Cytometry. Bioinformatics. ELISA. Antibodies. Humoral response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Tegumentar em 2018.	23
Figura 2 - Formas evolutivas do parasito <i>Leishmania</i> spp.	24
Figura 3 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	26
Figura 4 - Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar	27
Figura 5 – Esquema da resposta imunológica em uma infecção de <i>Leishmania</i> spp.	33
Figura 6 - Histogramas da porcentagem de antígenos recombinantes fluorescentes positivos.	58
Figura 7- Gráfico para seleção da população e histogramas do controle do acoplamento da proteína 0750 com as <i>beads</i> e o controle do conjugado.	65
Figura 8 – Histograma do limiar de detecção da proteína recombinante 0750 para amostras positivas e negativas de LT.	66
Figura 9 – Gráfico para seleção da população e histograma do controle do acoplamento da proteína 1140 com as <i>beads</i> e o controle do conjugado.	67
Figura 10 – Histograma do limiar de detecção da proteína recombinante 1140 para amostras positivas e negativas	68
Figura 11- Gráfico para seleção da população e histograma do controle do acoplamento da proteína quimérica PADRE com as <i>beads</i> e o controle do conjugado.	69
Figura 12 - Histograma do limiar de detecção da proteína quimérica PADRE para amostras positivas e negativas	70
Figura 13 - Curva ROC para determinar o <i>cut-off</i> para o teste de CF	71
Figura 14 - Resultados do teste de CF para pacientes portadores de LT	72
Figura 15 - Aplicabilidade da proteína 0750 para diagnóstico diferencial da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.	73
Figura 16 - Aplicabilidade da proteína 1140 para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.	74
Figura 17 - Aplicabilidade da proteína quimérica PADRE para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.	75
Figura 18 – Aplicabilidade do pool de peptídeos específicos (P1) para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.	76
Figura 19 – Aplicabilidade do pool de peptídeos inespecíficos (P2) para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.	77

Figura 20 – Reatividade cruzada para o teste convencional de ELISA com a fração de antígenos solúveis da <i>L (V.) braziliensis</i>	78
Figura 21 – Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos dos testes de ELISA e CF	79
Figura 22 – Comparação entre as curvas ROC dos pools de peptídeos P1 e P2 por ELISA e a CF	81
Figura 23 – Comparação entre as curvas ROC das proteínas recombinantes 1140 e 0750 por ELISA e a CF	82
Figura 24 – Comparação entre as curvas ROC da proteína quimérica PADRE por ELISA e a CF	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens dos métodos sorológicos para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar.....	38
Quadro 2 – Principais avanços utilizando a tecnologia da Citometria de fluxo como método de diagnóstico para as Leishmanioses.....	40
Quadro 3 – Proteínas recombinantes e peptídeos estudados para o diagnóstico da LT.....	43
Quadro 4 - Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes de LT.	50
Quadro 5 - Resultados dos exames laboratoriais para os pacientes de LT.	51
Quadro 6 - Resultado dos exames laboratoriais de pacientes portadores de LV	52
Quadro 7 - Características clínicas dos pacientes portadores de Psoríase	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de peptídeos sintéticos de <i>L. (V.) braziliensis</i> utilizados no estudo.....	45
Tabela 2 – Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos dos testes de ELISA e CF	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
SRL	Serviço de referência em Leishmaniose
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
ARFP	Percentual de ags-recs fluorescentes positivos
PPFP	Percentual de parasitos fluorescentes positivos
Curva ROC	Curva característica de operação do receptor
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
LT	Leishmaniose tegumentar
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucocutânea
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LV	Leishmaniose visceral
PSO	Psoríase
CF	Citometria de fluxo
IFI	Imunofluorescência indireta
ELISA	Ensaio imunoenzimático
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DAT	Teste direto de antiglobulina
IDRM	Teste de intradermoreação de Montenegro
IgG	Imunoglobulina G
APCs	Células apresentadoras de antígenos
IL	Interleucina
TNF	Fator de necrose tumoral
IFN	Interferon
DC	Células dendríticas
Treg	Células T regulatórias
AT	Antes do tratamento
PT	Pós-tratamento
DO	Densidade óptica

LIT	Liver Infusion Triptose
BSA	Albumina sérica bovina
SFB	Soro fetal bovino
PBS	Solução salina tamponada
IPTG	Isopropil-Beta-D- galactosídeo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
kDa	Kilo Dalton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS.....	22
1.1.1 Geral	22
1.1.2 Específicos	22
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	23
2.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	27
2.2 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	28
2.3 CRITÉRIO DE CURA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	30
2.4 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	31
2.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	35
2.5.1 Testes Parasitológicos.....	35
2.5.2 Testes Moleculares.....	36
2.5.3 Testes Sorológicos	37
2.4.3.1 Citometria de fluxo	38
2.5.4 Ferramentas de bioinformática para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar	41
2.6.4.1 Proteínas recombinantes, sequências peptídicas e proteínas quiméricas de <i>L. (V.) braziliensis</i> preditas <i>in silico</i>	43
3 JUSTIFICATIVA.....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	49
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICA	53
4.3 OBTENÇÃO DO SORO	54
4.4 ORIGEM DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E QUIMÉRICAS E DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DE <i>L. (V.) braziliensis</i>	54
4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E QUIMÉRICAS de <i>L. (V.) braziliensis</i>	55
4.6 ACOPLAMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E QUIMÉRICAS de <i>L. (V.) braziliensis</i> À ESFERAS DE POLIESTIRENO.....	57
4.7 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO PROTEÍNAS recombinantes <i>L. (V.) braziliensis</i>	57
4.7.1 Aquisição do ensaio de citometria de fluxo com proteínas recombinantes e	

proteínas quiméricas	58
4.8 OBTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. (V.) braziliensis</i>	59
4.9 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. (V.) braziliensis</i>	59
4.9.1 Aquisição do ensaio de citometria de fluxo com formas fixadas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	60
4.10 ENSAIO DE ELISA UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES, PROTEÍNAS QUIMÉRICAS E PEPTÍDEOS DE <i>L. (V.) braziliensis</i>	60
4.11 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE <i>L. (V.) braziliensis</i> PARA O TESTE DE ELISA.	61
4.12 REAÇÃO DE ELISA UTILIZANDO FRAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE <i>L. (V.) braziliensis</i>	62
4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DO DESEMPENHO DOS TESTESSOROLÓGICOS.	62
5 RESULTADOS	64
5.1 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE <i>L. (V.) braziliensis</i> 0750 POR CITOMETRIA DE FLUXO	64
5.2 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE <i>L. (V.) braziliensis</i> 1140 POR CITOMETRIA DE FLUXO	66
5.3 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA PADRE DE <i>L. (V.) braziliensis</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	68
5.4 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO CONVENCIONAL PARA PACIENTES PORTADORES DE LT.....	70
5.5 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA 0750 NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA	72
5.6 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA 1140 NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA	73
5.7 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA PADRE NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA	74
5.8 AVALIAÇÃO DO POOL DE PEPTÍDEOS ESPECÍFICOS P1 NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA.	75
5.9 AVALIAÇÃO DO POOL DE PEPTÍDEOS INESPECÍFICOS P2 NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA.....	76
5.10 ENSAIO DE ELISA CONVENCIONAL UTILIZANDO A FRAÇÃO DE	

ANTÍGENOS SOLÚVEIS DA <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> PARA VERIFICAÇÃO DE REATIVIDADE CRUZADA.....	77
5.11 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DOS TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	78
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES.....	90
8 PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE	113
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO MENOR DE 18 ANOS.....	116
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLES.....	121
APÊNDICE D - ARTIGO PUBLICADO 1	123
APÊNDICE E - ARTIGO PUBLICADO 2	134
ANEXO A - PARECER COMITÊ DE ÉTICA	145

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença parasitária, não contagiosa, considerada negligenciada, representando um grave problema de saúde pública. O Brasil é o país que apresenta a maior prevalência em notificações no continente americano, possuindo casos confirmados em todos os estados, onde a região Nordeste se destaca como uma das regiões consideradas endêmicas (TIUMAN *et al.*, 2011; NEGRÃO; FERREIRA, 2014). No estado de Pernambuco, a maioria dos casos ocorre na Zona da Mata, representando cerca de 65% do total de casos registrados (BRANDÃO-FILHO *et al.* 1999; NEGRÃO; FERREIRA, 2018).

Atualmente são conhecidas mais de 20 espécies de protozoários parasitos do gênero *Leishmania* capazes de infectar humanos. Dentre elas, a *L. (V.) braziliensis* é considerada o principal agente etiológico da LT no Brasil devido ao grande número de casos relacionados (CROFT; COOMBS, 2003; TIUMAN *et al.*, 2011). Essa doença abrange desde infecções assintomáticas, até o comprometimento da pele com lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas, podendo apresentar ainda formas mais graves com lesões nas mucosas, caso não tratadas (ARONSON, 2017).

A resposta imunológica tem início após a entrada dos parasitos no corpo humano, e o principal mecanismo protetor contra a infecção é dependente de linfócitos T. Além dessas células, é observada a presença de linfócitos B, produtoras de anticorpos, que também podem atuar modulando a resposta imune através da produção de citocinas (SILVA-BARRIOS, S; CHARPENTIER, T.; STÄGER, S., 2018). Contudo, o papel dessas células e dos anticorpos, no contexto da infecção do parasito, ainda não foi bem esclarecido. Por outro lado, a análise dos níveis de anticorpos anti- *Leishmania* tem permitido uma associação com as diferentes formas clínicas, visto que já foi observado um padrão entre os diferentes perfis de imunoglobulinas com as diferentes formas da doença (TRUJILLO *et al.*, 2000; REIS, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; ROMERO GA *et al.*, 2005).

Considera-se que para o controle efetivo da LT, seja necessário abranger o diagnóstico precoce, o tratamento quimioterápico dos infectados, controle do vetor e reservatórios, bem como, a aplicação de uma vacina para indivíduos saudáveis em área de risco, porém isto ainda não é uma realidade (MARIA RITA, 2016; OLIVEIRA, B.C. *et al.*, 2019). Dentre estas, o diagnóstico precoce é essencial para designar um tratamento específico, prevenir a evolução da doença e amenizar sintomas,

possibilitando uma maior qualidade de vida ao indivíduo acometido (ARONSON, N.; JOYA, C., 2019). Entretanto, até o momento, ainda não foi estabelecido um teste de diagnóstico considerado o padrão-ouro para essa doença (ARONSON *et al.* 2017).

Atualmente, o diagnóstico da LT é obtido através da associação de fatores baseados em características clínicas, dados epidemiológicos e testes laboratoriais (WIJERATHNA *et al.*, 2017). Entretanto, por apresentarem um amplo espectro clínico, as lesões apresentadas pelos pacientes podem ser facilmente confundidas com outras doenças como: tuberculose cutânea, hanseníase virchowiana, câncer de pele, sífilis, entre outras (TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015; FERREIRA, 2018). Em tais casos, diferentes abordagens parasitológicas, moleculares e sorológicas já foram descritas para uso no diagnóstico laboratorial da LT, variando na precisão dos resultados (DE BRITO, *et al.*, 2020).

Se tratando dos testes de abordagem sorológica, destaca-se o ensaio imunoenzimático (ELISA). Porém, este pode apresentar limitações como a variação na sensibilidade e especificidade, diretamente dependentes do tipo de antígeno escolhido (SRIVASTAVA *et al.*, 2011; DE VRIES, 2015; FREIRE, 2019). Assim, abordagens sorológicas alternativas vêm sendo estudadas para sua implementação na rotina do diagnóstico laboratorial, como a citometria de fluxo (CF) (OLIVEIRA *et al.*, 2013; DE CASTRO *et al.* 2017; SILVA *et al.* 2019). Todavia, a especificidade da CF principalmente frente a infecções recorrentes de outros parasitos da família Trypanosomatidae, continua sendo uma das principais limitações. (ROCHA *et al.*, 2002; PISSINATE, *et al.*, 2008; SILVESTRE, R., *et al.*, 2009).

Uma possível solução para a problemática da especificidade dos métodos, sobretudo em relação ao diagnóstico diferencial da LT, vem se fortalecendo com a expansão do uso de ferramentas de bioinformática. Estas, são exploradas como uma importante estratégia para obtenção de antígenos específicos do parasito *Leishmania*, visando aprimorar os métodos de diagnóstico existentes (FLOWER; DOYTCHINOVA, 2002; THOMAZ-SOCCOL, 2018).

Na perspectiva de buscar aperfeiçoar os métodos de diagnóstico disponíveis para LT, nosso grupo de pesquisa vem empregando o uso de ferramentas *in silico*. Um dos principais frutos dessa linha de pesquisa, foi a identificação de duas proteínas recombinantes do parasito *L. (V.) braziliensis* com potencial diagnóstico da LT (TAVARES D. H. C., 2017). Dez sequências peptídicas também do parasito *L. (V.)*

braziliensis, agora com potencial vacinal, foram identificadas (SILVA. R. F., 2016). Posteriormente, a partir dessas sequências, foram construídas duas proteínas quiméricas, inicialmente para avaliação como candidatas a uma potencial vacina para LT (OLIVEIRA, B.C., 2020).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho de metodologias sorológicas disponíveis, incorporando o uso de diferentes moléculas obtidas *in silico*, descritas anteriormente. Dessa forma, este estudo visa o desenvolvimento de um método mais sensível e específico para diagnóstico da LT.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial diagnóstico de diferentes moléculas preditas *in silico* na identificação de pacientes portadores da Leishmaniose tegumentar, por meio de métodos sorológicos.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

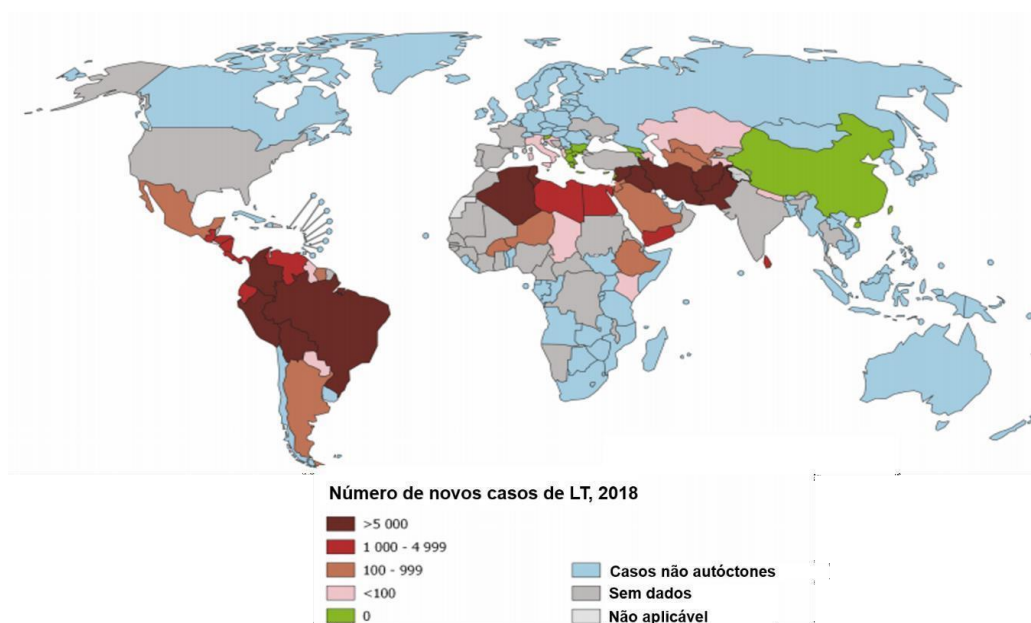
- a) Padronizar o acoplamento das proteínas recombinantes de *L. (V.) braziliensis* e das proteínas quiméricas com esferas de poliestireno;
- b) Avaliar o desempenho da CF na identificação de pacientes portadores de LT ativa, comparando o desempenho das proteínas recombinantes e proteínas quiméricas com formas promastigotas fixadas de *L. (V.) braziliensis*;
- c) Verificar a aplicabilidade da CF no diagnóstico diferencial com outras doenças (leishmaniose visceral e psoríase), comparando o desempenho das proteínas quiméricas e proteínas recombinantes com formas promastigotas fixadas de *L. (V.) braziliensis*;
- d) Avaliar o desempenho do teste de ELISA na identificação de pacientes portadores de LT ativa, comparando o desempenho das proteínas recombinantes e proteínas quiméricas com a fração de antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis*;
- e) Avaliar a aplicabilidade do teste de ELISA no diagnóstico diferencial com outras doenças (leishmaniose visceral e psoríase), comparando o desempenho das proteínas recombinantes e proteínas quiméricas com a fração de antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis*;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR (LT)

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, e a forma mais prevalente das Leishmanioses, e assim representa um problema de saúde pública mundial (BRASIL, 2017; MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2017). Estima-se que ocorram 1,5 milhões de novos casos anuais, distribuídos em 89 países (TORRES-GUERRERO, E. *et al.*, 2017). O continente americano é endêmico para a Leishmaniose Tegumentar (LT) (FIGURA 1), aqui conhecida como Leishmaniose Tegumentar América (LTA). Ela é considerada 1 das 22 doenças tropicais negligenciadas (DTNs) mais prevalentes, e segundo dados associados com morbidade (DALY – “Disability- Adjusted Life Years”), a LT é uma das 10 DTNs mais incapacitantes (HOTEZ; BOTTAZZI; STRYCH, 2016; MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2017).

Figura 1 – Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Tegumentar em 2018.



Fonte: Adaptado WHO, 2019.

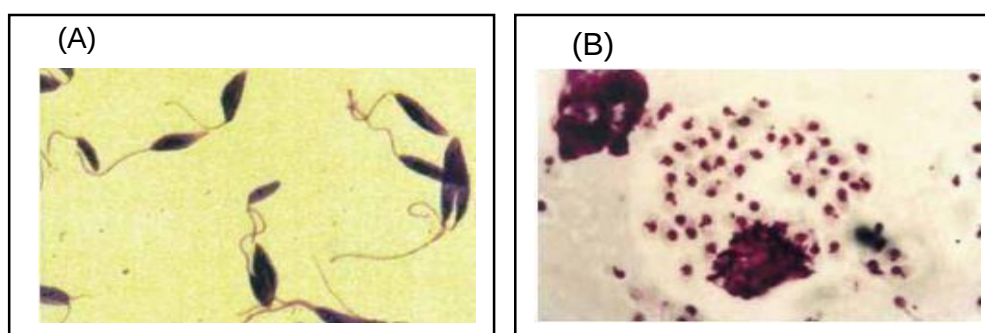
O Brasil apresenta a maior prevalência em notificações de LT das Américas, com casos confirmados em todos os estados, sendo as regiões Norte, Nordeste e Centro- Oeste consideradas endêmicas (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994; TIUMAN *et al.*, 2011; NEGRÃO; FERREIRA, 2014). Dos 49.959 casos que foram relatados à Organização Pan-Americana da Saúde (SisLeish - OPAS / OMS) em 2017, 72,6% foram registrados no Brasil (WHO/PAHO, 2019), onde 39% estavam concentradas na região Nordeste (VASCONCELOS; ROCHA; DE ARAÚJO, 2017). Em Pernambuco, a LT tem

incidência em todo o estado, porém com uma média de 64,2% dos casos na Zona da Mata (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2009).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN-NET), em Pernambuco, no período de 2010 a 2018, 3.147 casos de LT foram confirmados.

As leishmanioses são causadas por diversas espécies do parasito intracelular *Leishmania*, pertencentes ao reino Protista, filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e pertencentes a dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (SINGH *et al* 2006). Esses parasitos apresentam duas formas evolutivas durante o seu ciclo de vida: a forma promastigota, de morfologia alongada, com a presença de um flagelo livre (Figura 2A), localizada no tubo digestivo do inseto vetor; e a forma amastigota, de morfologia arredondada, sem a presença de flagelo aparente (FIGURA 2B), podendo ser observada em tecidos de hospedeiros vertebrados.

Figura 2 – Formas evolutivas do parasito *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado BRASIL, 2017.

Legenda: (A) apresenta a forma promastigota em meio extracelular; (B) apresenta a forma amastigota do parasito no interior de macrófagos.

Até o momento, foram descritas doze espécies de *Leishmania* relacionadas com os casos da LT humana nas Américas e oito espécies causadoras da doença em animais. No Brasil, existem sete principais espécies identificadas, sendo seis delas pertencentes ao subgênero *Viannia*. As espécies desse subgênero são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, como também as mais recentemente identificadas nas regiões Norte e Nordeste, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*. Dentro das espécies encontradas no Brasil, apenas uma é pertencente ao subgênero *Leishmania*, a *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017). A espécie *L. (V.) braziliensis* é considerada o agente específico da LT no Brasil, devido ao grande número de casos associados a essa

espécie no território nacional (CROFT; COOMS, 2003; TIUMAN *et al.*, 2011). Em Pernambuco, também foi considerada a principal espécie circulante através de análises das amostras isoladas de pacientes provenientes das áreas endêmicas do estado (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010).

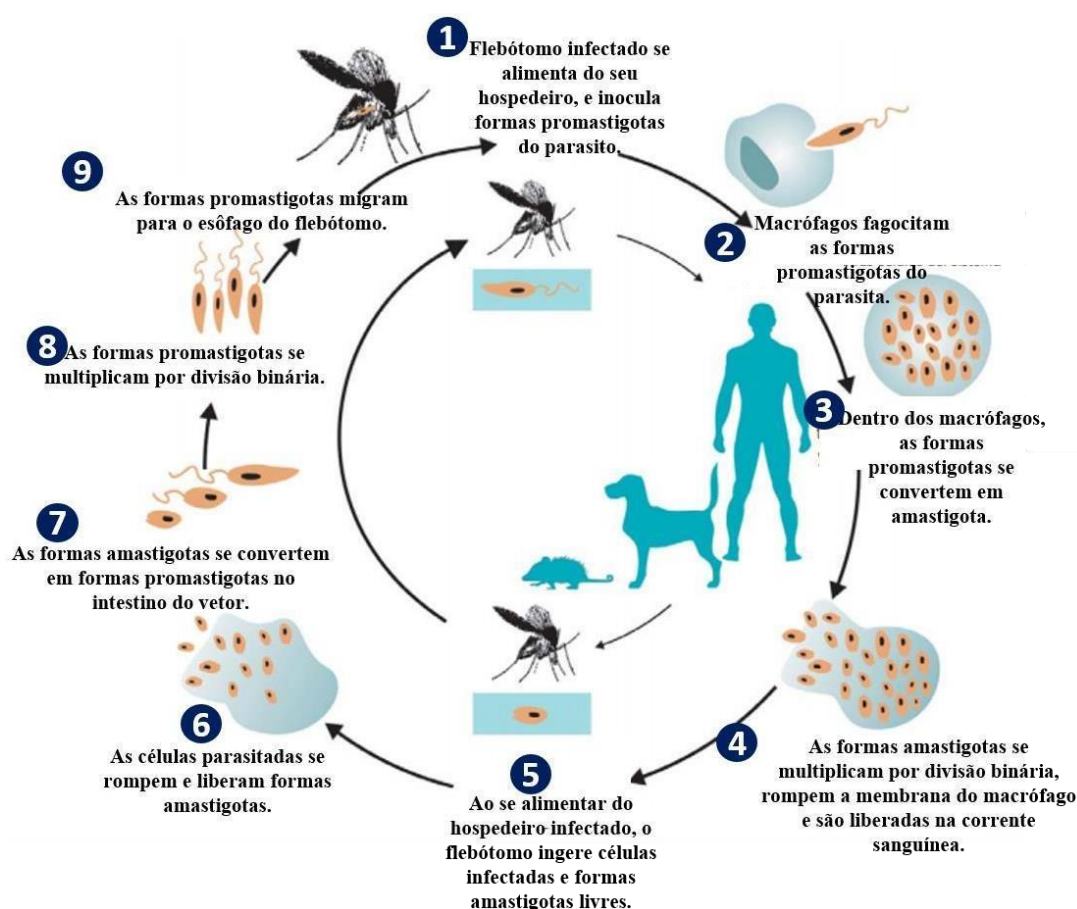
Essa doença é transmitida por fêmeas de insetos vetores, os flebotomíneos. Eles pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília *Phlebotominae*, gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Nas Américas, o gênero associado à transmissão da LT é o *Lutzomyia*, com cerca de 350 espécies distribuídas desde o Canadá até a Argentina. No Brasil, podem-se destacar as espécies: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia migonei* (AZEVEDO *et al.*, 1996; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; BRASIL, 2017). Essas espécies, dependendo da localização geográfica, são denominadas popularmente como birigui, mosquito-palha, entre outros (BRASIL, 2017). Nesses vetores, o parasito é encontrado na forma promastigota na luz do trato digestivo, e é inoculado através do repasto sanguíneo, junto à saliva, na pele dos hospedeiros mamíferos (DESJEUX 1996; PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

A transmissão vetorial é a principal forma conhecida de transmissão para as Leishmanioses, entretanto, existem casos mais raros de transmissão congênita, sexual e exposições ocupacionais (SIVAKUMAR R, 2004; BRITO, M. E. F., *et al.* 2012). Na literatura, já foram relatados onze casos de transmissão através de transfusão sanguínea, onde dez foram relatos de casos individuais na Ásia e Europa (JIMENEZ-MARCO, T. *et al.*, 2016).

O ciclo de vida do parasito *Leishmania* se inicia com o inseto vetor infectado, flebotomíneos fêmeas que apresentam hábito alimentar de hematofagia (FIGURA 3). Essas, se alimentam do sangue dos hospedeiros vertebrados e acabam, no momento do repasto sanguíneo, por inocular junto a sua saliva formas promastigotas na corrente sanguínea. Os parasitos são então fagocitados por células do sistema imune, a exemplo dos macrófagos. No interior dessas células, o parasito sofre modificações morfológicas e se converte em sua outra forma, a amastigota. Essas formas se multiplicam por divisão binária até eventualmente romperem a membrana celular e serem liberadas na corrente sanguínea, onde poderão infectar novas células. A partir daí, um inseto vetor ainda não infectado, ao se alimentar deste hospedeiro infectado, poderá ingerir as formas

amastigotas e células infectadas com o parasito. Elas irão seguir até a luz do trato gastrointestinal do inseto vetor e se convertem novamente em formas promastigotas. Essas, novamente se multiplicam por divisões binárias e migram para a faringe e esôfago do vetor e se tornam infectantes. O ciclo se reinicia, quando novamente um vetor infectado ao se alimentar do hospedeiro vertebrado inocula o parasito (DESJEUX, 2004; NEVES *et al.*, 2009; REITHINGER *et al.*, 2007; BRASIL, 2017).

Figura 3 – Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado PANAMÉRICAIN DE LA SANTÉ, Organisation. 2019.

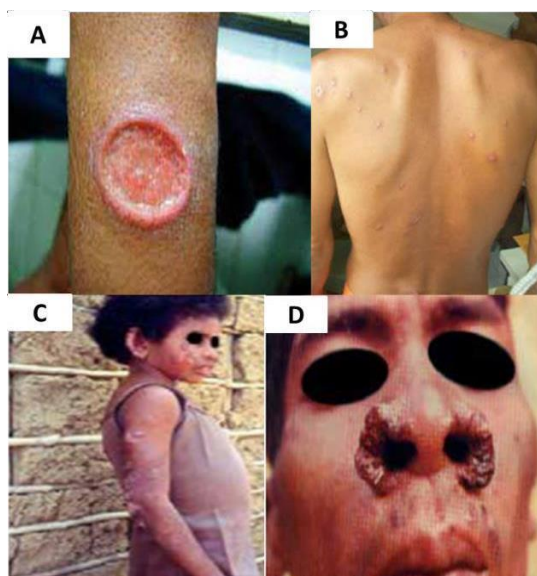
2.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A LT apresenta uma série de manifestações clínicas ligadas a diferentes fatores comumente relacionados com a espécie do parasito envolvido na infecção, com o vetor, e também, àqueles ligados ao hospedeiro, como o seu sistema imunológico, estado nutricional e fatores genéticos (REITHINGER *et al.*, 2007; CASTELLANO *et al.*, 2009; WHO, 2010). Embora seja considerado que para cada indivíduo acometido, a

forma clínica da LT esteja fortemente ligada a uma espécie do parasito, nenhuma espécie é exclusiva a apenas uma manifestação clínica (AMEEN, 2010).

Essa infecção pode se apresentar de duas principais formas: a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Mucocutânea (LM), e dentre elas, clinicamente, podem-se observar diferentes quadros clínicos, assim como, casos de infecções assintomáticas (FIGURA 4) (AMEEN, 2010; BRASIL, 2017). Esse último grupo é composto por indivíduos que foram expostos ao parasito, porém não chegam ao ponto de desenvolver lesões, podendo ser identificados apenas através da sorologia positiva ao agente infeccioso (DESJEUX, 2004; MARZOCHI; MARZOCHI,1994).

Figura 4 – Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana



Fonte: Adaptado de BRASIL,2017.

Legenda: A- Forma de Leishmaniose Tegumentar; B- Forma da Leishmaniose Tegumentar Disseminada; C- Forma da Leishmaniose Tegumentar Difusa; D- Forma da Leishmaniose Mucocutânea.

Na LT, as lesões podem se apresentar de forma localizada, difusa ou disseminada. A localizada (FIGURA 4a) é considerada a manifestação mais frequente da doença. Ela é caracterizada por apresentar uma única lesão, que ocorre geralmente, próximo ao possível local de inoculação dos parasitos, sendo essas áreas mais expostas, como face e membros superiores ou inferiores (BRASIL, 2017). Essas lesões apresentam atributos bastante peculiares, com uma morfologia arredondada, bordas elevadas, fundo avermelhado e granuloso, e indolor.

Em casos, onde ocorrem infecções secundárias por bactérias, pode haver produção de exsudato soro purulento e o indivíduo pode sentir dor. Esse tipo de lesão, de uma maneira geral, apresenta boas respostas ao tratamento e pode evoluir para a cura

espontânea, porém, caso não ocorra uma boa resposta, podem permanecer por alguns anos (MARZOCHI; MARZOCHI, 1992; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; REITHINGER *et al.*, 2007). Além disso, em relatos onde se não há um seguimento adequado ao tratamento, houve evolução para um quadro mais grave de LM (GOTO; LINDOSO, 2010; MANSUETO *et al.*, 2014).

Outra forma de LT é a forma disseminada (FIGURA 4b), não é considerada comum, pois representa apenas 2% dos casos notificados (BRASIL, 2017). Ela se caracteriza por apresentar numerosas lesões nodulares ou ulceradas, distribuídas por todos os segmentos do corpo do indivíduo acometido, que não apresentam, geralmente, uma possível relação com o local de inoculação do parasito através do vetor. Essa forma de infecção tem sido associada às espécies, *L.(V.) braziliensis*; *L.(L.) amazonensis*; *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*, como principais agentes causadores. Entretanto, a *L.(V.) braziliensis* é a espécie associada com um maior número de casos no país (BRASIL 2017; REITHINGER *et al.*, 2007; MARZOCHI; MARZOCHI,1994).

Considerada grave e rara, a forma difusa (FIGURA 4c) apresenta múltiplos nódulos e placas cutâneas, geralmente não ulceradas, distribuídas por todo o corpo sem relação com o possível local de picada do vetor. No Brasil, a espécie relacionada com o desenvolvimento dessa forma é a *L.(L.) amazonensis*. Até o momento, os casos não apresentam respostas eficientes através da terapia convencional (BARRAL *et al.* 1995; AMEEN, 2010; MANSUETO *et al.*, 2014).

Por fim, a forma mucocutânea (FIGURA 4d) é considerada a mais grave, e geralmente provém da cronicidade da forma LT em casos em que o tratamento não atingiu resultados eficientes. Assim, decorre o desenvolvimento de lesões secundárias destrutivas nas cavidades oronasal, na faringe e laringe, devido a uma resposta imunológica acentuada. Essa infecção também pode atingir a área ocular e a mucosa presente em órgãos genitais. No Brasil, a espécie relacionada com um maior número de casos de LM é a *L. (V.) braziliensis*; entretanto, já houve casos descritos na literatura atribuídos à *L. (L.) amazonensis* e à *L. (V.) guyanensis* (NEVES *et al.*, 2009; AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010; MANSUETO *et al.*, 2014).

2.3 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Nas Américas, é baixo o percentual de pacientes acometidos pela LT capazes de controlar a infecção e chegar a uma cura espontânea (COTA, G. F. *et al.* 2016). Sendo assim, a aderência a um tratamento se torna indispensável para regular a ação do

parasito no sistema (SILVA, R. E. *et al.*, 2016). O tratamento de primeira escolha, independente da forma clínica presente no paciente acometido, é realizado através de antimoniais pentavalentes. Esses compostos existem sob duas principais formas, o antimoniato de meglumine/antimoniato de N-metilglucamine (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), esse último não é comercializado no Brasil (DUQUE, *et al.*, 2016; BRASIL 2017). Essas drogas agem na via bioenergética das formas amastigotas do parasito, inibindo a glicólise e oxidação de ácidos graxos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; EVAN; KEDZIERSKI, 2012).

No Brasil, a dose recomendada para o tratamento da doença é de 15 mg/Kg/dia e de 20 mg/Kg/dia por vinte e trinta dias em média para LT localizada e disseminada, e para LM, respectivamente. A administração é realizada através de injeções intramusculares ou via endovenosa (OMS, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011), porém, são dosagens que necessitam de acompanhamento médico. Esse regime de tratamento apresenta uma porcentagem de cura que varia entre 71.3% e 91.4%, para pacientes portadores de LT (TUON F. F. *et al.*, 2008).

Já foi descrito que em um regime de dosagem de 20 mg/Kg/dia a droga pode atingir seu limiar de toxicidade levando a efeitos colaterais que acabam por inviabilizar o uso da droga para o paciente. Ademais, o tratamento da LT por antimoniais apresenta limitações, que por muitas vezes levam o paciente a desistir do tratamento. Essas limitações estão principalmente relacionadas à longa duração dos ciclos de uso do medicamento e as vias necessárias para administração. Outra dificuldade encontrada no tratamento são os diversos efeitos colaterais relacionados com a droga, como: mialgia, falta de apetite, vômitos, febre, dores de cabeça, insônia e toxicidade para o coração, fígado e sistema nervoso (TUON F. F. *et al.*, 2008).

A Anfotericina B e a Pentamidina, são classificadas como drogas alternativas para substituir o primeiro esquema terapêutico. Essas, são sugeridas apenas para aqueles casos que não alcançaram o resultado esperado com o tratamento baseado em antimoniais (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; DIRO, E *et al.*; 2015). É importante ressaltar que uso dessas drogas é realizado apenas sob acompanhamento médico (OMS, 2002). A anfotericina é uma droga de alta toxicidade e baixa tolerância e apresenta um grande número de efeitos colaterais (SANDE; MANDELL, 1987; FALCI; PASQUALOTO, 2015). Já a Pentamidina é utilizada no tratamento da LC desde 1974 e também apresenta alguns

efeitos adversos, porém já foi possível observar alguns casos com resultados satisfatórios para infecções associadas com a espécie *L. (V.) guyanensis* (ALKEMADE 1984; GADELHA *et al.* 1990; DIRO, E *et al.*, 2015).

Outras abordagens como o uso de antígenos recombinantes de *Leishmania* também têm sido testados como candidatos à imunoterapia. A associação entre antimoniais e imunomoduladores tem sido observada como um tratamento alternativo para pacientes refratários aos antimoniais (SCHWARTZ, J, 2017; TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S., 2018). Embora esta modalidade de tratamento esteja crescendo, ainda são necessários ensaios clínicos para confirmar o benefício na rotina clínica. É possível ainda, observar casos de pacientes com cura sem a interferência de drogas. Sugere-se que esses pacientes desenvolvem uma resposta imune capaz de controlar a sua infecção por *Leishmania* (CARVALHO, E. M. *et al.*, 1995).

2.4 CRITÉRIO DE CURA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

O critério de cura para a LT, até os dias atuais, é clínico com a cicatrização completa das lesões na pele. É recomendado que após a determinação da cura clínica, o paciente seja acompanhado por um profissional de saúde a cada dois meses até completar um ano do término do tratamento. Inúmeras abordagens buscam implementar um método capaz de acompanhar o paciente após o tratamento quimioterápico e determinar um critério de cura laboratorial para LT, contudo, tal método até então não existe (BRASIL, 2017).

Alguns testes parasitológicos já foram sugeridos como critério de cura, porém seu uso apresenta algumas limitações. Essas, sobretudo por existir uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de parasitos na lesão e o tempo de infecção. Dessa forma, em lesões tardias, a redução do número de parasitos observados através dos testes parasitológicos pode não indicar necessariamente uma resposta positiva ao tratamento (GUTIERREZ *et al.* 1991).

Desse modo, a imunidade humoral vem sendo apontada como um valioso indicador, que pode ser utilizado para o monitoramento do paciente até sua evolução para cura da doença. A OMS já sugeriu que testes sorológicos fossem utilizados como um auxiliar para confirmação da cura clínica (OMS, 1990). Um exemplo de teste sugerido é o ELISA, para avaliação dos níveis de anticorpos IgG durante o curso da infecção e ao longo do tratamento quimioterápico. Esse tipo de avaliação é bastante

significativo, pois pode oferecer dados sobre a evolução clínica, epidemiológica e controle da LT (MENDONÇA *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2005). Porém, o uso dos testes sorológicos como critério de cura ainda é bastante discutido, devido ao fato que os testes mais utilizados na rotina, como IFI e ELISA, podem apresentar limitações. Sobretudo, relacionados com a variação na sensibilidade e especificidade, reduzindo a confiabilidade dos resultados (SRIVASTAVA *et al.*, 2011; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Enquanto alguns trabalhos investigam o uso ferramentas moleculares para diagnóstico e controle (HERNÁNDEZ, C.; RAMÍREZ, J. D, 2013; DE PAIVA- CAVALCANTI, M. *et al*, 2015), outros buscam implementar um método sorológico alternativo, capaz de diagnosticar e confirmar o critério de cura determinado na rotina clínica. Um exemplo, é a citometria de fluxo, que se demonstrou cabível de diagnosticar a LT ativa, como também, monitorar os títulos de anticorpos ao longo do tratamento (PEREIRA *et al*, 2012; OLIVEIRA *et al*, 2013).

2.5 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Após a entrada do parasito no corpo do hospedeiro vertebrado, células da resposta imune inata, como neutrófilos, células NK, células dendríticas e macrófagos, são os primeiros a atuar contra o parasito (FIGURA 5).

Os neutrófilos são rapidamente recrutados ao sítio de infecção e podem agir fagocitando os parasitos para tentar eliminá-los. Contudo, podem servir como mediadores para a entrada de amastigotas em outras células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas (DC), sendo conhecidos como “Cavalos de Tróia” (PETERS, N. C. *et al*, 2008; SANTOS, S. C; BRODSKYN, C.I, 2014). Alguns trabalhos já relataram o papel positivo de neutrófilos contra infecção de *L. major* e *L. braziliensis*, interagindo com macrófagos infectados, através da produção de citocinas como TNF- α , auxiliando na ativação dos mecanismos efetores contra o parasito (NOVAIS, F. O *et al*, 2009; DE SOUZA CARMO, 2010; CARLSEN, *et al.* 2015).

O papel das células NK, em sinergia com outras células fagocíticas do sistema imunológico, constitui a primeira linha de defesa, através da produção de citocinas como TNF e IFN- γ (SCOTT; NOVAIS, 2016; IKEOGU, M. *et al.*, 2020). Já as DC têm um papel crucial para a ativação e transição para a resposta imune adaptativa contra *Leishmania* spp. Estas células apresentam antígenos nos linfonodos para os linfócitos T

virgens ativando-os e direcionando para um fenótipo Th1 via IL-12 (VON STEBUT, E, *et al*, 1998; SOUSA *et al.*, 2013).

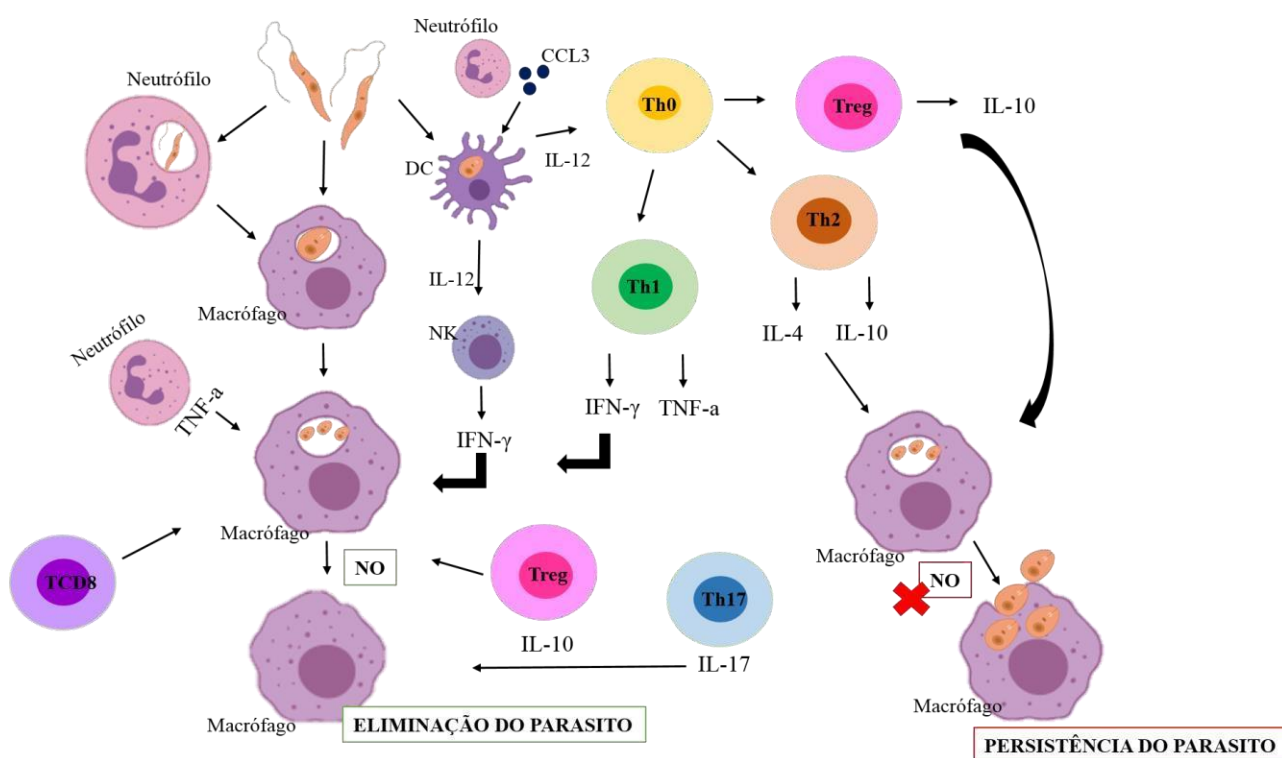
Os macrófagos (MΦ) apresentam um papel crucial, podendo servir como células hospedeiras para sobrevivência do parasito, pois é em seu interior que ele consegue realizar a sua conversão da forma promastigota para a amastigota, e consequentemente se multiplicar dentro da célula. Eles podem atuar na apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺, além de estarem envolvidos na produção de citocinas, modulando a diferenciação dos perfis dos linfócitos TCD4⁺ (SCOTT; NOVAIS, 2016). Os macrófagos são ativados através do contato direto com o parasito, e através de citocinas como o IFN-γ (ZER *et al.*, 2001). Quando ativadas, essas células passam a sintetizar óxido nítrico (NO), que leva à destruição parasitária (NOVAIS, F. O *et al*, 2014; SCOTT; NOVAIS, 2016).

Estudos em camundongos e humanos observaram que a resposta imunológica protetora para a infecção é primordialmente mediada por células T. Há uma diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção, relacionada com o perfil de células T CD4⁺ estimulado, podendo ser do tipo 1 ou 2, respectivamente (FIGURA 5) (BACELLAR *et al.*, 2002; DE LUCA; MACEDO, 2016). Os linfócitos T CD4⁺, que desenvolvem uma resposta de perfil tipo 1, estão comumente relacionados com a eliminação parasitária e ativação das respostas de tipo celular. Esse perfil tem sua diferenciação estimulada por citocinas como IL-12, TNF e IFN- γ, além de expressarem fator de transcrição t-bet. As células de perfil do tipo 2 estão relacionadas com susceptibilidade e multiplicação parasitária, elas são caracterizadas por secreção de IL- 4, IL-5, IL-10, IL-13 e expressam fator de transcrição GATA-3 (REIS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2013).

Outro subtipo de célula T CD4⁺ pode ser estimulado no curso da infecção, as chamadas células T regulatórias (Treg). Uma das formas de diferenciação das células Treg é a partir de células T virgens, por meio da presença de citocinas anti- inflamatórias, como a IL-10 e o TGF-β, além de expressar o fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3⁺). Elas migram dos linfonodos e se acumulam no local da infecção, onde atuam na regulação da ação das células efetoras locais (CAMPANELLI, ROSELINO, CAVASSANI K *et al.*, 2006; SAKAGUCHI *et al.*, 2008; NYLÉN, EIDSMO, 2012; DA SILVA SANTOS, BRODSKYN, 2014).

As células Th17 representam uma outra subpopulação de linfócitos TCD4 (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C. *et al.*, 2017). Estudos já demonstraram que essas células estão envolvidas com ativação acentuada da resposta imunológica, e isso atribui um papel duplo na infecção, podendo estar envolvida na resolução da infecção, como também, no seu agravamento (MILLS, 2008; KORN, T. *et al.* 2009; CURTIS, M. M.; WAY, S., 2009). A principal citocina secretada por essas células é a IL-17, potente pró-inflamatório, podendo participar da ativação e atração de neutrófilos para o sítio da infecção, e na expressão de outras citocinas, como IL-6 e IL-8 (LIU, Y., 2001; BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K., 2007; KAIKO, G. E. *et al.*, 2008; BAETEN, D. LP; K., V. K., 2013).

Figura 5: Esquema da resposta imunológica em uma infecção de *Leishmania spp.*



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: MO: macrófago, IL: interleucina, IFN: interferon; TNF: fator de necrose tumoral. Resposta imunológica contra o parasito *L. (V.) braziliensis*.

Nota: Após inoculação do parasita na corrente sanguínea o primeiro estágio de defesa se inicia com a resposta imune inata, onde neutrófilos são rapidamente recrutados para o local de entrada do parasito. Essas células podem interagir com macrófagos, através da produção de citocinas como TNF-α, auxiliando no estímulo para ativar as funções efetoras dos macrófagos, resultando na eliminação parasitária. Os macrófagos também são recrutados para o local da infecção e atuam fagocitando os parasitos. Os neutrófilos ainda podem recrutar células como as DC, através da produção da quimiocina CCL3. Após sua chegada no sítio de infecção, as DC atuam na transição para o início da ação da resposta imune

adaptativa, com a ativação de células T através da apresentação de antígenos. As células T CD4 que são estimuladas podem apresentar dois diferentes perfis de resposta, o Th1 e Th2. Essa diferença é mediada através das citocinas que estão sendo produzidas por outros grupos celulares. O perfil Th1 é associado com a eliminação parasitária e ativação das respostas imunológicas de tipo celular, mediado por citocinas como, IL-12, TNF e IFN- γ . Por outro lado, o perfil Th2 está relacionado com susceptibilidade e multiplicação parasitária. Nesse perfil atuam as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. As células Th17 também são observadas; porém, o seu papel na resposta ainda não foi bem elucidado. Outro tipo de célula T encontrado são as células Treg. Essas se diferenciam a partir de células T virgens por meio da citocina IL-10. As mesmas atuam na regulação de toda a rede de células atuantes na resposta imune.

As células B, além de produtoras de anticorpos, se mostram relacionadas com o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, como IFN- γ , TNF, IL-13 e IL-6 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados pelo subgênero *Viannia*. Além disso, estudos *in vitro* já demonstraram a ação de anticorpos anti-*Leishmania* promovendo a lise de formas promastigotas do parasito em sinergia com o sistema complemento, facilitando o processo de fagocitose ((PEDRAS *et al.*, 2003; FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012). Já foi possível observar que existe uma influência no padrão de citocinas produzido com a proliferação e diferenciação das células B produtoras de imunoglobulinas (TRUJILLO *et al.*, 2000; PEDRAS *et al.*, 2003; FAGUNDES-SILVA *et al.*, 2012).

A intensidade observada na resposta humoral se mostra diretamente relacionada com a carga parasitária e com a cronicidade da infecção (REIS, 2007). Já foi descrito que são observados altos títulos dos isotipos específicos anti-*Leishmania*, exceto IgD, para as diversas manifestações clínicas da LT (TRUJILLO *et al.*, 1999). As subpopulações de linfócitos do tipo 1 e 2 induzem a síntese de diferentes isotipos devido aos seus diferentes perfis de secreção de citocinas. É descrito que citocinas do tipo 1, como o IFN- γ estimulam a produção do isotipo IgG1 (OZBILGE *et al.*, 2006). Porém, quando é associada à citocina IL-6, acaba por induzir a produção de outro isotipo, o IgG2, e antagonizam a produção de IgG1 por células B (BACELLAR *et al.*, 2002; DE LUCA; MACEDO, 2016). As citocinas que são secretadas no perfil de tipo 2, como IL-4 e IL-5, estão associadas com a produção dos isotipos IgG3, IgG4, IgE e IgA em humanos. Dentre essas, a citocina IL-4 é a principal indutora de IgG3, IgG4 e IgE (ROMERO GA *et al.*, 2005).

Nas formas da LT e LM, tem sido observada a predominância de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 associados com um perfil do tipo 1. Já na LT difusa, foi descrito a predominância do isotipo IgG4 associada a um perfil de resposta do tipo 2 (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 2005). Além disso, altos níveis de IgE são

observados em pacientes com um maior tempo de evolução da infecção (O'NEIL, C. E.; LABRADA, M.; SARAIVA, N. G., 1993).

2.6 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O diagnóstico da LT é geralmente realizado com base em uma associação de características clínicas, dados epidemiológicos e testes laboratoriais (NEVES, 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Porém, há uma problemática atrelada ao aspecto clínico, devido ao fato de que essa infecção pode apresentar-se sob diferentes formas. Sendo assim, as lesões podem ser facilmente confundidas na rotina clínica com outras doenças dermatológicas, como a tuberculose cutânea, esporotricose, psoríase, hanseníase virchowiana, infecções micóticas, úlcera tropical, sífilis, e até mesmo com alguns tipos de carcinomas e linfomas (PISSINATE *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015).

Desse modo, os métodos laboratoriais são pontos fundamentais para a determinação de um diagnóstico diferencial da doença. E com isso, um grande número de técnicas com diferentes abordagens parasitológicas, moleculares e sorológicas já foram descritas na literatura (GOTO, H.; LINDOSO, 2010). Porém, o desempenho de cada teste proposto depende de fatores como a espécie de *Leishmania* envolvida, a carga parasitária, o tipo e número de lesões apresentadas pelos pacientes (ARONSON, N. E.; JOYA, C. A., 2019). A escolha final do método utilizado acaba sendo principalmente por questões ligadas à infraestrutura e aos recursos disponíveis, ao invés de ser baseada no teste que apresenta a maior precisão no seu resultado (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; KOBETS; GREKOV; LIPODOLVÁ, 2012).

2.6.1 Testes Parasitológicos

Os testes de diagnóstico com abordagem parasitológica têm como princípio a visualização de formas amastigotas do parasito, e apresentam uma alta especificidade (DE VRIES; 2015). Esses testes, são realizados a partir de amostras das lesões obtidas através de biópsias e escarificações da pele, e consistem na identificação de formas amastigotas do parasito. Dentro dessa abordagem, os testes mais utilizados são: pesquisa direta; isolamento em cultura e inoculação em animais, variando no seu desempenho, sobretudo a sensibilidade (GOTO; LINDOSO, 2010; PAIVA- CAVALCANTI, 2015).

A técnica de pesquisa direta, embora seja um método simples, rápida e de baixo custo, apresenta variação na sensibilidade, podendo ser de 50% a 70%, dependendo do número de parasitos presentes na lâmina preparada (GOTO; LINDOSO, 2010). Há uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de parasitos na lesão e o tempo de infecção, dessa forma a positividade do teste também varia em relação ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano (VEGA-LÓPEZ, 2003; BENSOUSSAN, 2006).

No método de isolamento do parasito para cultura *in vitro*, a sensibilidade pode variar entre 15% e 84%, segundo o que já foi observado em trabalhos na literatura (CUBA-CUBA *et al.*, 1984; MENGISTU *et al.*, 1992; ROMERO *et al.*, 2001; FABER *et al.*, 2003). Essa variação pode estar relacionada com o tempo da lesão, a espécie de *Leishmania*, o uso de drogas anti-*Leishmania* e a técnica de coleta utilizada (CUBA-CUBA *et al.*, 1984).

Por último, o método de diagnóstico por inoculação em animais para cultura *in vivo* tem como principais limitações a sua sensibilidade baixa e variável, entre 38% a 52%. Além disso, é um método que necessita de um período maior de execução para atingir a etapa de formação das lesões nos animais (RODRIGUES, 2000; GOTO, LINDOSO, 2010; BRASIL, 2017).

Sendo assim, os métodos parasitológicos de maneira geral demandam altos custos, e ainda dependem de mão de obra qualificada, tanto para coleta das amostras necessárias, quanto para execução dos métodos, dificultando sua implementação na rotina laboratorial (WHO 2017).

2.6.2 Testes Moleculares

Diversos testes de diagnóstico baseados em abordagens de biologia molecular vêm sendo explorados ao longo dos anos de forma que possam superar as limitações encontradas nos métodos convencionais. De forma geral, esses testes se baseiam na identificação rápida do material genético do parasito e demonstram altos valores de sensibilidade, que podem variar de 91% a 98% (GOTO; LINDOSO, 2010; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; DE VRIE; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

O teste mais utilizado dentro dessa abordagem para o diagnóstico da LT, é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esse teste consiste na amplificação de segmentos específicos de DNA a partir de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) pareados

especificamente nas margens da região alvo. Ele apresenta muitas vantagens por ser uma técnica sofisticada e versátil, onde podem ser utilizadas pequenas quantidades de amostra, evitando métodos de coleta invasivos para o paciente. Porém, há uma problemática que limita o seu uso na rotina laboratorial das áreas acometidas por um grande número de casos. E isso se dá principalmente pela necessidade de infraestrutura laboratorial, mão de obra qualificada para execução do teste, e falta de uma metodologia padrão para realização do método nos diferentes laboratórios (SINGH, 1997; GOMES *et al.*, 1999; RODRIGUES, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2002; REITHINGER *et al.*, 2007; DE ASSIS SOUZA *et al.*, 2013).

2.6.3 Testes Sorológicos

Esses testes são classificados como métodos indiretos, pois seu princípio não é baseado na identificação do parasito, e sim no reconhecimento da resposta imune celular e/ou humoral produzida no organismo do indivíduo acometido pela infecção (ARONSON, N. E.; JOYA, C. A., 2019; OPS, 2019).

Os métodos sorológicos apresentam vantagens por se tratar de testes menos invasivos ao paciente. Eles possuem rápida execução, permitem identificar um paciente infectado antes mesmo da formação das lesões, e ainda apresentam a possibilidade de automação (GOMEZ-OCHOA, P. *et al.*, 2003; MABEY, D., *et al.*, 2004; SANTARÉM, N. *et al.*, 2010; SOUZA, A. P. *et al.*, 2013; ZANETTI, A. S. *et al.* 2019). Diferentes técnicas já foram desenvolvidas e implementadas como importantes ferramentas para o diagnóstico de infecções ocasionadas por *Leishmania* spp. (DE BRITO *et al.*, 2020).

No Brasil, os testes mais utilizados na rotina laboratorial são: a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Entretanto, os valores de sensibilidade e especificidade de ambos os testes variam de acordo com a composição do antígeno escolhido, a espécie relacionada com a infecção, e também com as diferentes manifestações clínicas dos indivíduos acometidos (QUADRO 1) (SUNDAR, S.; RAI, M, 2002; GOTO; LINDOSO, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2014; ZANETTE, M. F. *et al.*, 2014; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; PAIVA CAVALCANTI *et al.*, 2015).

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens dos métodos sorológicos para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar.

MÉTODO	ANTÍGENOS	VANTAGEM	LIMITAÇÃO	REFERÊNCIAS
ELISA	Proteínas recombinantes/ extrato solúvel do parasito	Baixo custo/ Versátil/ Rápida execução/ Sensível	Especificidade altamente dependente do antígeno escolhido	Gomes <i>et al.</i> , 2014; De Vries; Reedijk; Schallig, 2015; Freire, 2019
IFI	Parasitas fixados	Relativamente sensível	Laborioso/ Baixa especificidade/ Análise subjetiva	Brito <i>et al.</i> , 2009; Leveque, 2020
Citometria de Fluxo	Parasitas fixados	Método sensível, relativamente específico, capacidade multiplex, diferencia doença ativa e curados	Reação cruzada com portadores de doenças causadas por outros Tripanossomatídeos	Martins-filho, <i>et al.</i> , 1995; Oliveira <i>et al.</i> , 2013; Mendes <i>et al.</i> 2019

Fonte: Adaptado de De Paiva-Cavalcanti *et al.* (2015).

O teste de ELISA, dentre os testes sorológicos disponíveis, é o que apresenta os maiores índices de sensibilidade. Entretanto, como mencionado anteriormente, essa sensibilidade é variável (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOMES *et al.*, 2014; GOTO; LINDOSO, 2010). Dessa forma, dificulta o diagnóstico para aqueles indivíduos que apresentam baixos níveis de anticorpos, até mesmo em estágios iniciais da doença, como também, para indivíduos assintomáticos (FREIRE *et al.*, 2019). Além desse fator, uma das principais limitações ainda no uso desse método é em relação a sua especificidade. Frequentemente são observados altos índices de resultados falso-positivos devido as reações cruzadas com outras infecções ocasionadas por organismos da família Trypanosomatidae, como a Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral (BRITO *et al.*, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010; DALTRO, *et al.*).

Consequentemente, uma das grandes metas atuais da pesquisa para a LT é a investigação de meios que permitam o aperfeiçoamento dos métodos existentes, ou até mesmo, de novos métodos alternativos para diagnóstico dessa doença.

2.6.3.1 Citometria de fluxo

A Citometria de Fluxo (CF), é uma tecnologia que desde o seu desenvolvimento vem sendo aprimorada, tornando-se uma ferramenta valiosa para diversas áreas da pesquisa (ROBINSON, J. P.; ROEDERER, M., 2015). Seu conceito se baseia na análise de partículas em suspensão que se movem em um fluxo e são interceptadas por um feixe de luz. As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos conjugados a fluorocromos, permitindo a identificação e a quantificação das

células através do tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2015).

A metodologia da CF permite a execução de diversos tipos de ensaios, sendo eles qualitativos ou quantitativos. Por isso, é indicada para ensaios onde se busca avaliar desde a expressão proteica, viabilidade e apoptose celular, até ensaios de triagens e diagnósticos (ABRAHAM, R. S.; AUBERT, G., 2016). O uso dessa ferramenta revolucionou a pesquisa clínica, e atualmente, é uma técnica certificada na rotina dos Laboratórios Centrais (LACENs), que são referência para o diagnóstico e acompanhamento de indivíduos soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (DU *et al.* 2015; PAI, N. P. *et al.*, 2020). Além disso, também é uma implementada para o diagnóstico de vários tipos de câncer, como a leucemia (KEENEY; HEDLEY; CHIN- YEE, 2017).

No contexto do diagnóstico das Leishmanioses (QUADRO 1), inúmeros progressos utilizando essa tecnologia vêm sendo descritos baseados na quantificação de anticorpos anti-parasito (QUADRO 2). Trabalhos mais recentes demonstram a versatilidade, alta sensibilidade e reprodutibilidade da CF, destacando seu potencial para multiplexagem, quando comparada aos métodos convencionais para diagnóstico das leishmanioses (OLIVEIRA *et al.*, 2013; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.* 2015; DE CASTRO *et al.* 2017; SILVA *et al.* 2019). A possibilidade de aplicação para monitoramento dos títulos dos pacientes submetidos aos tratamentos, e, conseqüentemente, para a determinação de um critério de cura, também já é uma realidade (MENDES *et al.* 2019).

Quadro 2 – Principais avanços utilizando a tecnologia da Citometria de fluxo como método de diagnóstico para as Leishmanioses.

REFERÊNCIAS	FORMA DA LEISHMANIOSE / ESPÉCIE DO PARASITO	PRINCIPAIS AVANÇOS COM A CITOMETRIA DE FLUXO
Pereira <i>et al.</i> 2012	LT (<i>L.braziliensis</i>)	Uso de formas promastigotas vivas e fixadas do parasito como antígeno do teste de CF
Oliveira <i>et al.</i> 2013	LT (<i>L.braziliensis</i>)	CF demonstrou maior acurácia para diagnóstico e monitoramento dos pacientes em relação a outros imunoensaios
Sousa <i>et al</i> 2013	LVC – <i>L. Infantum</i>	<i>beads</i> magnéticas e proteínas recombinantes na CF para diagnóstico sensível de formas clínicas e subclínicas
Pedral – Sampaio <i>et al</i> 2016	LT - <i>L.braziliensis</i>	Utilização de microesferas de poliestireno cobertas com antígeno solúvel do parasita aumentando a sensibilidade
Teixeira-Carvalho <i>et al.</i> 2015	LV e LT humana	Desenvolvimento do FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1
Silva <i>et al.</i> 2019	LV humana (<i>L.infantum</i>)	Alta sensibilidade (96%) em comparação com o teste de ELISA
Mendes <i>et al.</i> 2019	LT (<i>L.braziliensis</i>)	Uso de formas fixadas do parasita como antígeno e o IgG1 contribui para aumento da especificidade do teste para diagnóstico, além da possibilidade de uso como critério de cura
Ker <i>et al.</i> 2019	LVC (<i>L.infantum</i>)	Uso de antígenos recombinantes (rLci1A/rLci2B) para diagnóstico multiplex com alta sensibilidade e especificidade

Legenda: LV – Leishmaniose Visceral; LVC- Leishmaniose Visceral Canina; LT – Leishmaniose Tegumentar Americana; CF- Citometria de Fluxo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

No intuito de aperfeiçoar e inovar o diagnóstico por CF, proteínas específicas do parasito vêm sendo identificadas e utilizadas como antígenos dentro da metodologia de diagnóstico da CF (KER *et al.* 2019). Dentre as vantagens, essa nova abordagem de diagnóstico tem demonstrado consideráveis avanços na sensibilidade e especificidade para o diagnóstico das leishmanioses visceral humana e canina em comparação com os métodos sorológicos convencionais (DIAS, D.E *et al.* 2018; KER *et al.* 2019).

2.6.4 Ferramentas de bioinformática para o imunodiagnóstico da LT

As ferramentas de predição de dados *in silico*, que avaliam e selecionam as informações e características particulares de interesse, permitem uma escolha mais racional de uma molécula alvo e auxiliam no sucesso das técnicas, obtendo resultados mais específicos e sensíveis (ARROYO-SANCHEZ, M.C *et al* 2001; KORBER; LABUTE; YUSIM, 2006; HODOS, R. A. *et al.*, 2016; BYRNE, R.; SCHNEIDER, G., 2019).

Dessa forma, o uso dessas ferramentas para estudos imunológicos acabou por gerar um grande impacto na pesquisa, expandindo-a em um campo específico da bioinformática, denominado de imunoinformática (PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2012; TOMAR; DE, 2010). Essa área é caracterizada por avaliar as moléculas e os processos envolvidos na imunidade, em grau de estrutura, função, e ainda, as interações individuais entre cada molécula (PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2012; TOMAR; DE, 2010). Uma abordagem de destaque é a capacidade de identificar, caracterizar e prever epítomos antigênicos que possam ser reconhecidos como alvos para células da resposta imune, como linfócitos B e T, nos processos de uma reação contra um determinado patógeno (KORBER *et al.*, 2006; PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2012; TOMAR; DE, 2010; TAVARES, D. H. C, 2017).

Os métodos de predição de epítomos se destacam por seu caráter inovador, e suas aplicações têm ampliado as barreiras dentro dos métodos de imunodiagnósticos (NOYA, O *et al*, 2003; FLOWER, 2013). Os antígenos expressos na superfície de agentes infecciosos, ainda são o componente chave na estruturação dos testes imunológicos utilizados na rotina laboratorial. Sendo assim, a forma como são identificados, selecionados e produzidos é essencial para garantir o bom desempenho dos testes (NOYA, O. *et al*, 2003).

Consequentemente, vem sendo bastante explorada a abordagem de predição de epítomos conservados, espécie-específicos, reconhecíveis como alvo por linfócitos B, e que posteriormente, são convertidos em uma molécula alvo (NOYA, O. *et al*, 2003; MAKSIMOV, *et al.*, 2012; MENEZES-SOUZA, *et al.*, 2014; LU, Y. *et al.*, 2015; YASSER; DOBBS; HONAVAR, 2017; SUN, P. *et al.*, 2019; SALARPOUR, *et al.*, 2020). Essa, capaz de indicar um indivíduo doente, através da detecção de anticorpos

circulantes contra um agente infeccioso (GOMARA, M. J.; HARO, I, 2007; PETERS, B. *et al.* 2005).

Além da obtenção de resultados mais sensíveis e específicos, o emprego dessas moléculas no diagnóstico traz inúmeras vantagens por se tratar de moléculas relativamente fáceis e baratas de produzir, armazenar e transportar. Além disso, ainda apresentam a possibilidade de uma produção em larga escala e da incorporação de proteínas carreadoras, resíduos de cisteínas e ácidos graxos, para a ampliação dos seus resultados (HANS, D., YOUNG, P. R.; FAIRLIE, D. P., 2006; GOMARA, M. J.; HARO, I., 2007; KURRIKOFF; APHKHAZAVA; LANGEL, 2019).

Diversos testes para diagnóstico utilizando essas moléculas específicas como antígenos foram estudados ao longo dos anos. Como por exemplo, no trabalho de Mishra *et al* em 2017, utilizando peptídeos frente ao teste de ELISA, para diagnosticar pacientes de tuberculose. E no trabalho de Alcaro *et al* em 2003, que também demonstrou o uso de peptídeos no diagnóstico, dessa vez, para diagnosticar infecção pelo vírus HIV. Em outro estudo, Pandiaraja *et al* em 2010, utilizou peptídeos sintéticos para diagnosticar filariose humana. Prosseguindo com essa linha de pesquisa, muitos outros testes utilizando essa abordagem estão disponíveis no mercado, como kits de ELISA utilizando peptídeos sintéticos para identificar anticorpos contra a bactéria *Chlamydia trachomatis* (GUPTA, K. *et al.*, 2018).

Dentro desse contexto, para infecções parasitárias, como no caso das Leishmanioses, onde ainda não há uma técnica considerada padrão-ouro, existe a necessidade de desenvolver um método de diagnóstico rápido e efetivo (BRITO, *et al.* 2000; ARONSON, *et al.*, 2016). Dentre os diversos testes já indicados para o diagnóstico, os de abordagem sorológica são os mais utilizados, auxiliando para as medidas de controle da infecção. Porém, esses testes apresentam variação no seu desempenho, além de um grande índice de falso-negativos e reação cruzada com outras infecções semelhantes (FONSECA, A. M., *et al*, 2014; DE PAIVA-CAVALCANTI, M., *et al* 2015).

Nos últimos anos, o uso dessas novas abordagens aliadas à bioinformática tem sido muito explorado, onde um dos principais focos é a busca de novas moléculas derivadas e específicas de um agente infeccioso. Dessa forma, elas podem ser utilizadas em conjunto aos métodos de diagnóstico, visando aprimorar o seu desempenho (VEGA-

LÓPEZ, F, 2003; NOYA, O. *et al*, 2003). Na literatura é possível encontrar algumas proteínas recombinantes e peptídeos específicos com seus respectivos desempenhos no diagnóstico da LT em indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis*, principalmente através do teste de ELISA (QUADRO 3).

Quadro 3: Proteínas recombinantes e peptídeos estudados para o diagnóstico da LT.

REFERÊNCIA	PEPTÍDEO/PROTEÍNA	DESEMPENHO	TÉCNICA
MENEZES-SOUZA, D. <i>et al</i> / 2015	rCatL	ESP: 95.71 SENS: 95.56%	ELISA
MENEZES-SOUZA, D. <i>et al</i> 2015	rLbMAPK3 rLbMAPK4	rLbMAPK3 ESP: 71.43% SENS: 83.08% rLbMAPK4: ESP:97.14 % SENS: 75.38 %	ELISA
DUARTE, Mariana C. <i>et al</i> . 2015	Proteína hipotética	ESP: 95.4% SENS: 85%	ELISA
LIMA, M. P. <i>et al</i> /2017	LbHyM	SENS:100 % ESP: 98.0%	ELISA
SATO, C. M., <i>et al</i> . 2017	rLb8E rLb6H	rLb6H ESP: 100.0% % SENS: 93,9 % rLb8E ESP: 83.3% SENS: 83.3%	ELISA
LINK, J. S. <i>et al</i> 2017	Peptídeos sintéticos (P1, P2, P3 e MIXP1P2P3)	MIX SENS: 79%% P1 SENS: 72% ESP: 78-100%	ELISA
DE SOUZA, <i>et al</i> . 2019	LbK39	ESP: 98% SENS: 88%	ELISA

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: Esp: Especificidade; Sens: Sensibilidade; Ptn: Proteína.

2.6.4.1 Proteínas recombinantes, sequências peptídicas e proteínas quiméricas de *L(V.) braziliensis* preditas *in silico*.

Com base no que foi discutido até o momento, nosso grupo vem investindo na linha de pesquisa de imunoinformática aplicada ao contexto das Leishmanioses e seus

desafios atuais, obtendo como fruto trabalhos como os de SILVA. R. F. (2016), TAVARES D. H. C. (2017) e OLIVEIRA, B.C. (2020).

Em seu trabalho, TAVARES D. H. C. (2017) empregou o uso de ferramentas de bioinformática e de bancos de dados disponíveis, para realizar análises no proteoma predito do parasito *L. (V.) braziliensis*. Dessa forma, o principal objetivo do estudo foi identificar e caracterizar potenciais epítomos de antígenos reconhecíveis dentro da resposta imunológica por linfócitos B. A partir dessas análises, foram selecionados os melhores candidatos, e estes foram otimizados para expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Posteriormente, deram origem à duas proteínas recombinantes com potencial para implementação no diagnóstico, identificadas como LbrM.22.1140 e LbrM.05.0750 na base de dados Trityp (www.tritypdb.org).

Outro trabalho que anteriormente já havia explorado essa linha de pesquisa foi o de SILVA. R. F. (2016). Este, utilizou abordagens *in silico* com o propósito de identificar possíveis sequências peptídicas com potencial vacinal. Das análises realizadas, as sequências foram ranqueadas por sua competência em se ligar aos complexos de histocompatibilidade principal (MHC). Como principal resultado, foram identificadas dez sequências peptídicas, com cerca de quinze aminoácidos cada. A Tabela 1 descreve as moléculas identificadas no estudo.

Tabela 1: Lista de peptídeos sintéticos de *L.(V.) braziliensis* utilizados no estudo

Peptídeo	Sequência	ID da proteína	Característica
P1	FLYYYILCYARDFGS	LbrM.34.3630	Proteína hipotética, conservada
P2	GNDHYEYILWKYHG	LbrM.14.1680	Synaptojanin (N-terminal), putativa
P3	ISFEIYPAHLFYSLI	LbrM.06.0820	Proteína hipotética, conservada
P4	PFLYYYILCYARDFG	LbrM.34.3630	Proteína hipotética, conservada
P5	APFLYYYILCYARDF	LbrM.34.3630	Proteína hipotética, conservada
P6	VFYTISFDQMERYLA	LbrM.01.0110	Proteína hipotética, conservada
P7	YTISFDQMERYLAAI	LbrM.01.0110	Proteína hipotética, conservada
P8	HNAPFLYYYILCYAR	LbrM.34.3630	Proteína hipotética, conservada
P9	NDHYEYILWKYHGA	LbrM.14.1680	Synaptojanin (N-terminal), putativa
P10	TVFYTISFDQMERYL	LbrM.01.0110	Proteína hipotética, conservada

Fonte: (FREITAS-E-SILVA *et al.*, 2020).

Esses peptídeos ainda foram utilizados para testes *in vitro*, que demonstraram imunogenicidade frente a células de pacientes portadores de LT. Do total dos dez peptídeos, cinco apresentaram um perfil de resposta específica, estimulando os grupos de pacientes portadores de LT. Esses cinco peptídeos (2, 4, 8, 9 e 10) foram agrupados em um pool de resposta específica, denominado P1. Os outros cinco (1,3,5,6 e 7), apresentaram um perfil de resposta inespecífica, estimulando tanto o grupo de pacientes de LT, quanto o grupo controle saudável. Esses peptídeos foram organizados em um outro pool de resposta inespecífica, denominado P2 (OLIVEIRA, B.C, 2020).

Considerando que novas moléculas imunogênicas do parasita também podem ser avaliadas para diagnóstico, das dez sequências peptídicas identificadas no trabalho anterior de SILVA. R. F. (2016), duas proteínas quiméricas foram construídas pelo nosso grupo (OLIVEIRA, B.C, 2020). Para a construção das proteínas, foram adicionadas duas sequências espaçadoras, o PanDrEpitope (PADRE) e GPGPG, entre cada par de peptídeos. Como estratégia de construção, uma das proteínas contém ambos os espaçadores, e a outra apenas o PADRE. A escolha desses espaçadores foi baseada em discussões da literatura, que demonstraram a capacidade do espaçador PADRE em

estimular células T. Em relação ao espaçador GPGPG, já foi descrito que auxilia no processamento e apresentação de epítomos para o MHC (PARK *et al.*, 2010; SAADI M, KARKHAH A, NOURI HR, 2017).

Desse modo, esses trabalhos têm ampliado as possibilidades de estudos para que o potencial diagnóstico dessas moléculas no contexto da LT seja investigado.

3 JUSTIFICATIVA

A LT é uma infecção considerada negligenciada e em expansão, tornando-se cada vez mais prevalente. O Brasil é um dos países endêmicos para a doença, com casos confirmados em todo o território. Dentre eles, Pernambuco está entre os estados com o maior número registros (TIUMAN *et al.*, 2011; NEGRÃO; FERREIRA, 2018). Os principais meios de controle da doença devem abranger o diagnóstico precoce e tratamento quimioterápico dos infectados, bem como vacinação dos indivíduos saudáveis e em área de risco, porém isto ainda não é uma realidade (MARIA RITA, 2016; ALVES, 2017). Assim, devido à falta de um método de diagnóstico padrão-ouro, existe uma grande dificuldade na detecção da doença. Dessa forma, a determinação do resultado definitivo é obtida através da combinação de abordagens clínicas, epidemiológicas e laboratoriais (WIJERATHNA *et al.*, 2017). Diversos testes já foram descritos e são utilizados livremente para o diagnóstico laboratorial (DE BRITO, *et al.*, 2020). As técnicas de diagnóstico sorológico convencionais (ELISA e IFI), podem apresentar controvérsias, sobretudo ligadas à sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade variáveis (ALVES; 2004; DE VRIES, 2015). Uma possibilidade dentro dos imunoenaios é a plataforma de CF, visto que é uma tecnologia versátil e promissora para diversas aplicações, incluindo diagnóstico. No contexto das LT, essa plataforma vem sendo estudada e demonstrando resultados satisfatórios para diagnóstico, sobretudo de sensibilidade (OLIVEIRA, *et al.*, 2016; MENDES *et al.*, 2019). Nesse cenário, um dos grandes objetivos das pesquisas no âmbito das Leishmanioses se concentra em encontrar formas de superar as atuais dificuldades acerca do diagnóstico, seja por meio do aperfeiçoamento dos métodos existentes, ou através do desenvolvimento de novas técnicas. Dessa forma, encontra-se a vertente das pesquisas e análises *in silico*, que proporcionam acesso a um maior número de dados gerados, e ao mesmo tempo permite uma escolha mais racional de moléculas alvo. Em consequência, possibilita a obtenção de resultados mais específicos e sensíveis (KORBER; LABUTE; YUSIM, 2006; HODOS, R. A. *et al.*, 2016; BYRNE, R.; SCHNEIDER, G., 2019). Diante dessa perspectiva, o nosso grupo vem investindo nos atuais desafios do diagnóstico e desenvolvimento de vacinas para as Leishmanioses, destacando trabalhos anteriores TAVARES D. H. C. (2017), SILVA. R. F. (2016) e OLIVEIRA, B.C, (2020). Estes obtiveram como principal resultado das análises *in silico* do proteoma do parasito *L (V.) braziliensis*, a geração de duas proteínas recombinantes, dez sequencias peptídicas vacinais, e duas proteínas quiméricas,

respectivamente. Portanto, o presente estudo pretende contribuir com o estudo de um método sorológico alternativo e eficaz, avaliando o perfil diagnóstico dessas moléculas frente aos imunoenaios como o teste de ELISA e a Citometria de fluxo. Assim, pretende-se aplicar esse método para a detecção precoce e diferencial de portadores da LT.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população desse estudo foi obtida em parceria com o Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães (SRL/IAM), constituída por residentes de municípios da Zona da Mata de Pernambuco, região considerada área endêmica para LT. Inicialmente, os pacientes foram encaminhados dos postos de saúde de cada município de origem para o Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) em Recife. Após avaliação clínica, realizada por uma médica dermatologista, cada paciente ficou ciente do objetivo do estudo, concordando ou não em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE). Só após da assinatura do termo, ocorreu a coleta de 10 ml de sangue. O material coletado foi processado no SRL/IAM, onde testes laboratoriais para diagnóstico foram realizados: pesquisa direta; punção aspirativa para inoculação em hamster, biópsia, imunofluorescência indireta (IFI) e reação em cadeia de polimerase (PCR). As alíquotas de soro das amostras positivas em pelo menos dois testes laboratoriais foram cedidas para o Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, onde os experimentos foram realizados.

Para o estudo em questão, foram selecionados 30 pacientes de ambos os sexos, com idades variando de 11-71 anos, portadores de lesões ativas sem tratamento quimioterápico prévio com Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina) (QUADRO 4). Os testes laboratoriais para a confirmação do diagnóstico dos pacientes estão apresentados no QUADRO 5.

Quadro 4 – Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes de LT.

Paciente	Sexo	Idade	Localidade	Forma Clínica	Nº de lesões	Local da lesão
P1	F	13	Moreno – PE	Ulcerada	2	Membro S.
P2	M	11	Moreno – PE	Ulcerada	1	Pé
P3	F	24	Moreno- PE	Ulcerada	1	Tornozelo
P4	F	30	Moreno- PE	Ulcerada	1	Tornozelo
P5	F	71	Timbó- PE	Placa	1	Maléolo E
P6	F	55	Moreno- PE	Disseminada.	>9	Perna D
P7	M	29	Paudalho- PE	Ulcerada	1	Mão
P8	M	49	Bonança- PE	Ulcerada	1	Perna D
P9	M	38	Moreno- PE	Ulcerada	1	Mão
P10	F	32	Moreno- PE	Ulcerada	7	Braço
P11	F	19	Moreno- PE	Recidivo	1	-
P12	M	34	Cabo de S.A- PE	Ulcerada	1	Mão
P13	M	38	Moreno- PE – PE	Ulcero- crostosa	1	Pavilhão auricular
P14	M	19	CIMNC – PE	Ulcerada	1	Perna
P15	M	7	Ipojuca- PE	Ulcerada	2	Perna D
P16	F	34	Ipojuca- PE	Ulcerada	1	Perna E
P17	M	33	Ipojuca- PE	Ulcerada	1	Perna D
P18	M	22	Goiânia- PE	Ulcero- crostosa	2	Coxa
P19	M	54	Moreno- PE	Ulcerada	3	Braço/Face/Q ueixo
P20	M	58	Moreno- PE	Ulcerada	1	Mão E
P21	M	24	Paudalho- PE	Ulcerada	1	Mão E
P22	M	49	Moreno- PE	Ulcerada	1	Perna
P23	F	62	Moreno- PE	Ulcerada	1	Perna
P24	M	58	Moreno- PE	Disseminada.	>10	Tronco/Braço s
P25	M	63	Moreno- PE	Ulcerada	1	Pé
P26	F	65	Moreno- PE	Ulcerada	1	Mão
P27	F	47	Moreno- PE	Ulcerada	1	Mão
P28	M	22	Paudalho- PE	Ulcerada	1	Mão
P29	F	62	Moreno- PE	Ulcerada	1	Perna
P30	F	19	Moreno- PE	Ulcerada	1	Mão

Fonte: Elaborada pelo Autor (2021).

Legenda: F- feminino; M- masculino; PE- Pernambuco; CIMNC – Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti.

Quadro 5 – Resultados dos exames laboratoriais para os pacientes de LT.

Paciente	Pesquisa Direta	Punção aspirativa	PCR	Biopsia
P1	NEG	POS	POS	NR
P2	POS	POS	POS	NR
P3	POS	POS	POS	NR
P4	NEG	POS	POS	NR
P5	NEG	POS	POS	NR
P6	POS	POS	POS	NR
P7	NR	POS	POS	POS
P8	POS	POS	POS	POS
P9	NR	POS	POS	NR
P10	NEG	POS	POS	NR
P11	NR	POS	POS	NR
P12	POS	POS	POS	NR
P13	NEG	POS	POS	NR
P14	NEG	POS	POS	POS
P15	NR	POS	POS	NR
P16	NEG	POS	POS	NR
P17	POS	POS	POS	NR
P18	POS	POS	NEG	NR
P19	POS	POS	POS	NR
P20	POS	NR	POS	NR
P21	NR	POS	POS	NR
P22	NR	POS	POS	NR
P23	NR	POS	POS	NR
P24	NR	POS	POS	NR
P25	POS	POS	POS	NR
P26	NR	POS	POS	NR
P27	NR	POS	POS	NR
P28	NR	POS	POS	NR
P29	NR	POS	POS	NR
P30	NR	POS	POS	NR

Fonte: Elaborada pelo Autor (2021).

Legenda: NR- não realizado; POS- positivo; Neg- negativo;

As amostras de pacientes portadores de Leishmaniose Visceral (LV) e Psoríase (PSO) foram incluídas para avaliação de reatividade cruzada. As amostras de soro de pacientes com LV foram obtidas do biorepositório do Laboratório de Doenças Transmissíveis do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE (IAM). Foram selecionadas 30 amostras de pacientes de ambos os sexos, com idade variando de 17-70 anos. Os pacientes foram triados a partir de testes de diagnósticos imunológicos (teste rápido imunocromatográfico rK39, DAT, ELISA e IFI), molecular (PCR) e por diagnóstico parasitológico (exame direto a partir da punção da medula óssea). Foram adicionados no estudo aqueles que apresentavam resultados positivos para o padrão

ouro (teste parasitológico) e/ou pelo menos dois testes dos demais exames laboratoriais (QUADRO 6).

Quadro 6: Resultado dos exames laboratoriais de pacientes portadores de LV.

Paciente	rK39	DAT	PCR	KATEX	PARASITOLÓGICO	ELISA	IFI
P1	POS	POS	NR	NR	NR	NR	NR
P2	POS	POS	NR	POS	NR	POS	POS
P3	POS	POS	NR	POS	NR	POS	POS
P4	POS	POS	NEG	NEG	NR	POS	POS
P5	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS
P6	POS	POS	NR	POS	NR	POS/	POS
P7	POS	POS	NEG	POS	NR	POS	POS
P8	POS	POS	POS	NR	NR	NR	NR
P9	POS	POS	POS	NR	NR	NR	NR
P10	POS	POS	POS	NR	NR	POS	POS
P11	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P12	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P13	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P14	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P15	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P16	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P17	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P18	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P19	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P20	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P21	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS
P22	POS	POS	POS	NR	POS	NEG	POS
P23	POS	POS	NR	POS	POS	POS	NEG
P24	POS	POS	POS	POS	NR	POS	POS
P25	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
P26	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P27	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P28	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG
P29	NR	NR	NR	NR	POS	NR	NR
P30	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

Fonte: Elaborada pelo Autor (2021).

Legenda: NR- não realizado; POS- positivo; Neg- negativo.

As amostras de soro de pacientes com Psoríase foram obtidas do biorepositório do laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM) do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE (IAM). O grupo foi composto por pacientes de ambos os sexos, com idade variando de 25-80 anos, confirmados para a doença por avaliação clínica, apresentando sinais da doença, como descrito no QUADRO 7. Ademais, o grupo controle foi constituído por 10 indivíduos saudáveis, residentes em áreas não endêmicas pra LT e que concordaram em assinaram o TCLE.

Quadro 7: Características clínicas dos pacientes portadores de Psoríase.

Paciente	Sexo	Idade	P. (anos)	Forma de Psoríase				
				P. CC	P. UNHA	D. ART	P. INV	P. PP
P1	M	41	1	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	SIM
P2	F	73	4	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
P3	M	38	20	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
P4	F	73	36	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
P5	M	43	17	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
P6	M	56	20	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
P7	F	76	16	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
P8	M	49	8	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
P9	M	35	3	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
P10	M	73	15	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
P11	F	65	8	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM
P12	M	28	2	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
P13	M	80	3	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
P14	F	33	11	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO
P15	F	43	2	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
P16	M	73	2	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM
P17	F	61	34	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
P18	M	25	1	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
P19	F	60	39	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
P20	M	72	15	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
P21	F	30	4	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
P22	F	32	10	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Legenda: P. CC- Psoríase do couro cabeludo; P. UNHA – Psoríase da unha; D. ART – Dor articular; P. INV – Psoríase invertida; P. PP - Psoríase palmo-plantar. Tempo de Inf. – Tempo de infecção em anos.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O protocolo de estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/FIOCRUZ (CAAE 73699817.0.0000.5190). A coleta de materiais biológicos somente ocorreu após o paciente concordar em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e após a anuência da instituição envolvida. Os procedimentos metodológicos do presente projeto estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o código de ética, resolução 466/12 do Conselho nacional de Saúde (CNS) e complementares. Garantimos o sigilo e anonimato relacionado às informações obtidas na pesquisa respeitando as recomendações da resolução.

4.3 OBTENÇÃO DO SORO

A partir do sangue coletado, o soro foi obtido após uma centrifugação de 400 X g por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras de soros foram inativadas a 56°C por 30 minutos e centrifugadas a 4°C, 1000 X g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aliquotado e estocado a -20°C até sua utilização.

4.4 ORIGEM DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES, QUIMÉRICAS E DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DE *L.(V.) braziliensis*

As proteínas recombinantes Lbrm1140 e Lbrm0750 foram identificadas e descritas em um estudo anterior realizado por TAVARES *et al* (2018). O objetivo principal desse estudo foi realizar uma análise *in silico* no proteoma predito da *L. (V.) braziliensis*, buscando identificar possíveis epítomos imunogênicos e específicos para células B.

Como estratégia de identificação desses epítomos, inicialmente foi criado um banco de dados relacional e a ele foram depositados os proteomas de *L. (V.) braziliensis* e outras espécies relacionadas: *L. major* e *L. infantum*. Assim, foram selecionadas sequências de *L. (V.) braziliensis*, que apresentaram um nível de conservação acima de 70%, entre as outras espécies avaliadas. O próximo passo consistiu em avaliar algumas características que indicavam bons candidatos a epítomos, como nível de similaridade com proteínas de humanos e camundongos e localização celular.

A partir dessas características, foi empregado o uso de três diferentes algoritmos preditores de epítomos de célula B, o AAP12 (CHEN, J. et al., 2007), BCPredi12 (EL-MANZALAWY, Y.; DOBBS, D.; HONAVAR, V., 2008) e BepiPred (LARSEN, J.; LUND, O.; NIELSEN, M., 2006), para seleção de antígenos que possuísem o maior número de potenciais epítomos imunogênicos para o diagnóstico da LT. Todos os dados gerados foram ranqueados e as sequências que apresentavam um maior número de epítomos foram enviadas para a síntese, resultando em sequências codificadoras para duas proteínas recombinantes denominadas de 0750 e 1140.

A seleção dos peptídeos sintéticos de *L. (V.) braziliensis* foi fruto de um estudo prévio do grupo (SILVA, R. F. et al, 2016). Para tal, métodos de predição foram utilizados para pesquisa de epítomos lineares e conformacionais de células CD4⁺ e CD8⁺ no proteoma predito de *L. (V.) braziliensis*. A tabela 1, já mencionada anteriormente, descreve os dez peptídeos obtidos.

Esses peptídeos foram utilizados para testes *in vitro* demonstrando imunogenicidade frente a células de pacientes portadores de LT (FREITAS-E-SILVA, R. DE *et al.*, 2020). Do total dos dez peptídeos, cinco apresentaram um perfil de resposta específica, estimulando os grupos de pacientes portadores de LTA. Esses cinco peptídeos foram agrupados em um pool de resposta específica, denominado P1. Os outros cinco apresentaram um perfil de resposta inespecífica, estimulando tanto o grupo de pacientes de LTA, quanto o grupo controle saudável. Esses peptídeos foram organizados em um outro pool de resposta inespecífica, denominado P2 (OLIVEIRA, B.C, 2020).

Ademais, a partir da combinação das dez sequências peptídicas discutidas anteriormente, foram construídas duas proteínas quiméricas, visando avaliação no sorodiagnóstico. Para construção dessas proteínas foram adicionados sequências espaçadoras a cada par de peptídeos. As sequências espaçadoras escolhidas foram o PanDrEpitope (PADRE) e GPGPG, sendo a primeira capaz de estimular células T e a segunda capaz de facilitar o processamento e apresentação de epítomos para o MHC. Em uma das proteínas obtidas, foram inseridas as duas sequências espaçadoras, PanDrEpitope (PADRE) e GPGPG, essa foi denominada de GPG. Para a outra proteína, foi adicionado apenas o espaçador PanDrEpitope (PADRE), essa intitulada então de PADRE.

4.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES E QUIMÉRICAS DE *L.(V.) braziliensis*

As proteínas recombinantes de *L.(V.) braziliensis* 1140 e 0750 foram obtidas de acordo com o protocolo utilizado por TAVARES *et al* (2018), e as proteínas quiméricas de acordo com (OLIVEIRA, B.C, 2020). Desse modo, para as proteínas recombinantes clones de células de *Escherichia coli* BL21 foram transformadas com plasmídeos de expressão, pRSETa, contendo a sequência codificadora de cada proteína. Em relação as proteínas quiméricas, clones de *Escherichia coli* BL21 foram transformadas com plasmídeos de expressão pET29a, este contendo a sequência codificadora dessas proteínas. Os plasmídeos pRSETa e pET29a permitem a fusão da sequência da proteína de interesse a uma sequência de polihistidinas (6xHis) na porção N- e C- terminal, respectivamente, para fins de reconhecimento e purificação.

As células transformadas foram cultivadas inicialmente a 37° C durante 16 horas, sob agitação de 160 rpm. Esse cultivo foi realizado com 20 mL de meio Luria

Bertani (LB) líquido com o antibiótico ampicilina (100 µg/mL), para a 1140 e 0750, e antibiótico kanamicina (10 µg/mL) para a PADRE e GPG. Após esse período, foram adicionados 10 ml da cultura em um novo recipiente contendo 250ml de meio LB e ampicilina. Esse novo recipiente foi deixado sob agitação até atingir uma densidade óptica (D.O) de 0,5 em um comprimento de onda de 600 nm. Após atingir a D.O, foi acrescentado o isopropil-Beta-D- galactosídeo (IPTG), indutor de expressão análogo à lactose, e mantido por 3 horas sob agitação a 28°C e 160rpm.

Os sedimentos celulares obtidos após a etapa anterior, induzidos por IPTG, foram utilizados e ressuspensos em 20mL de tampão de lise e equilíbrio (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de uréia, 20 mM de imidazol – pH 8,0). Após essa etapa, essas células foram solubilizadas através de ultra-sonicação, com 6 pulsos de 30 segundos e intervalos de 1 minuto, a 4° C, e foi adicionado o Triton X-100 (1%). Por fim, o material passou por uma centrifugação de 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante obtido, foi incubado por 1 hora com 500 µL de resina Ni-NTA agarose (*Qiagen*) pré-equilibrada com o tampão de lise e equilíbrio, a 4° C, sob leve agitação. Além disso, também foi incubado com a resina sob as mesmas condições citadas anteriormente.

A próxima etapa consistiu na centrifugação do conteúdo a 6000x g por 1 minuto, onde o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em um tubo cônico e posteriormente congelado a -80°C. A resina foi lavada 3 vezes com 1ml do tampão de equilíbrio através de etapas de suspensão e centrifugação. Após a última etapa, foram realizadas mais duas lavagens por 5 minutos com um tampão desnaturante em pH 6,0 (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Ureia, 40 mM de imidazol). Em seguida, foi realizada a etapa de eluição através de lavagens com o tampão de eluição (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Ureia, 1 M de imidazol – pH 4,5). Para cada etapa de lavagem realizada, o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em uma temperatura de -80°C. Com os produtos da eluição e da resina foi realizado gel SDS-PAGE 15% para avaliação da produção proteica, visualizados após coloração com Azul de Coomassie R-250. Por fim, as proteínas obtidas foram quantificadas segundo protocolo de Bradford (Bradford, 1976), utilizando uma curva padrão de BSA (Albumina sérica bovina).

4.6 ACOPLAMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES E QUIMÉRICAS DE *L. (V.) braziliensis* À ESFERAS DE POLIESTIRENO

Para o acoplamento, foram utilizadas partículas esféricas de poliestireno adquiridas comercialmente (GKisker PPs-0,8 poliestireno). O tubo foi homogeneizado no vórtex por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µL das partículas esféricas (aproximadamente 1×10^7 beads) em um tubo cônico, 100 µL de uma das proteínas recombinantes ou de uma das proteínas quiméricas (1mg/mL) e 1,8 mL de PBS 1x (pH 7,2). A incubação da mistura foi realizada sob agitação leve e constante por 1 hora a 25° C e protegida de luz. Após esse período de incubação, a mistura foi lavada com 4ml de PBS1x, com 3000x g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, o sedimento utilizado foi ressuspenso em 4 mL de PBS 1x.

4.7 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES *L. (V.) braziliensis*

Para os ensaios de CF utilizando as proteínas purificadas, foram utilizadas placas de 96 poços de fundo em “U”, e adicionados, na primeira fileira 198 µL de PBS 1x com 10% BSA (pH 7,2) e nas demais 100 µL do mesmo. Os soros foram testados em uma concentração de 1:100, para tal foram adicionados 2 µL na primeira fileira, para um volume final de 200 µL. Nos demais poços foi feita uma diluição seriada até a concentração final de 1:12800. Em seguida, foram retirados 80 µL de cada poço e adicionados 20 µL das beads conjugadas com uma das proteínas testadas. Após essa etapa, a placa foi incubada por 20 minutos ao abrigo da luz, a 25° C.

Logo após, foi realizada uma lavagem na placa com 200 µL de PBS 1x com 10% BSA, a 3100rpm por 5 min, desprezando o sobrenadante vertendo a placa. Após essa etapa, foram adicionados 20 µL do anti-IgG humano conjugado ao isotiocianato de fluoresceína-FITC (Sigma Chemical Corp. St. Louis, MO), diluído na concentração 1:200 em PBS 1x. A placa foi novamente incubada a 25 °C por 20 minutos ao abrigo da luz, e após incubação foi repetida a etapa de lavagem descrita anteriormente. Mais uma vez, o sobrenadante foi descartado por inversão e os sedimentos de cada poço ressuspenso em 200 µL de PBS 1x.

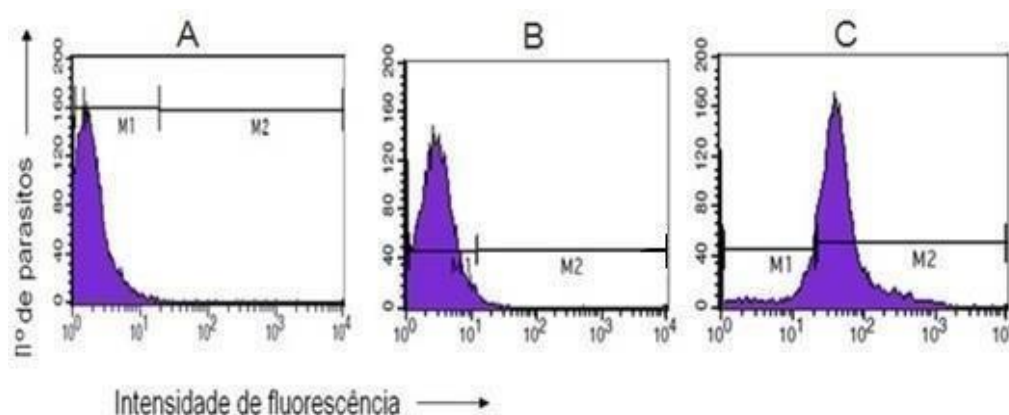
Por fim, o conteúdo dos poços foi retirado e transferido para tubos de citometria, onde permaneceram armazenados a 25° C, ao abrigo de luz, até a leitura no citômetro de fluxo.

4.7.1 Aquisição do ensaio de citometria de fluxo com proteínas recombinantes e proteínas quiméricas

As aquisições foram realizadas por meio de um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Company, San Jose, USA), equipado com um laser de argônio (comprimento de onda 488 nm), utilizando o software CELL QuestPro™ (BD Bioscience, San Jose, CA) para a aquisição. Foram adquiridos 5000 eventos de um quadrante de *beads*, baseada em parâmetros de tamanho e granulosidade. Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos ags-recs (antígenos recombinantes acoplados a *beads* de poliestireno) após incubação com soros obtidos dos pacientes e soros controle foram expressos sob a forma de percentual de ags-recs fluorescentes positivos (ARFP), observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado.

O ARFP foi determinado para cada amostra através do estabelecimento de um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado. Para cada experimento foi estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de ARFP para o controle interno da reação. Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, os valores de ARFP para amostras individuais foram obtidos. A Figura 6 mostra o histograma de ARFP sobre o qual os dados foram analisados.

Figura 6 - Histogramas da porcentagem de antígeno recombinantes fluorescentes positivos.



Fonte: Histograma realizado pela autora no programa CellQuestPro®.

Legenda: A: Controle interno da reação (Contendo as esferas de poliestireno acopladas as proteínas testadas e o anticorpo secundário) ; B: Controle negativo; C: Amostra de paciente positivo. M1 corresponde à região negativa e M2 à região positiva no histograma.

4.8 OBTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) braziliensis*

A princípio, alíquotas de culturas das formas promastigotas da *L. (V.) braziliensis*, provenientes da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903), mantidas *in vitro* foram expandidas em meio Schneider's até atingir a fase exponencial de crescimento. Em seguida, os parasitos foram transferidos para tubos de polipropileno de 50 mL, e submetidos a uma centrifugação leve (100 X g) a 25°C por 10 minutos. Logo após, os parasitos foram recuperados do sobrenadante e lavados em solução salina tamponada contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), por três vezes, a 4°C, 871 X g durante 10 minutos. O sedimento formado foi homogeneizado cuidadosamente e ressuspenso em uma solução fixadora de paraformaldeído a 1%, depois incubado por 24 horas a 4°C. Após a incubação, os parasitos foram lavados com salina tamponada contendo 3% de SFB, por duas vezes. Em seguida, a alíquota de parasitos da suspensão foi contada em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para o ensaio de Citometria de Fluxo.

4.9 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO FORMAS PROMASTIGOTAS FIXADAS DA *L. (V.) braziliensis*

O ensaio de citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos anti-formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foi realizado de acordo com Rocha *et al.* (2002) no equipamento FACS Calibur (Becton & Dickson) com aquisição de 20.000 eventos. Em uma placa de 96 poços com o fundo em "U", foram adicionados 50 µL das amostras de soro dos pacientes (diluídos nas concentrações de 1:64 a 1:32.768 em PBS contendo 10% de SFB) e a placa foi incubada *overnight* na temperatura de 4°C.

A seguinte etapa consistiu com incubação dos soros, onde foram adicionados 45 µL de uma suspensão de parasitos (5×10^6 /poço) e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos em uma estufa de CO₂. Posteriormente, a placa foi lavada duas vezes com 150 µL de PBS-10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (1000 X g por 10 minutos, temperatura ambiente). Em seguida, foram adicionados à placa 50 µL dos isotipos de IgG humana (na concentração de 1:200) e incubado novamente a 37°C por 30 minutos em uma estufa de CO₂. Novamente, após a incubação a placa foi lavada como já descrito.

Para a última etapa, as amostras da placa foram fixadas com a adição de 200 µL de solução de paraformaldeído a 1%. As amostras foram mantidas por 30 minutos a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo. As leituras das

amostras foram realizadas em um período máximo de 24 horas após a fixação dos parasitos.

4.9.1 Aquisição do ensaio de citometria de fluxo com formas fixadas do parasito *L. (V.) braziliensis*

Os resultados foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado. O PPFP foi determinado para cada amostra através do estabelecimento de um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado (Ligação do parasito, anticorpo secundário e fluorocromo).

Para cada experimento, foi estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de PPFP como o controle interno da reação (controle do conjugado). Em seguida, foi empregado o mesmo marcador e foram obtidos os valores de PPFP para amostras individuais. A aquisição dos dados e estratégia de análises foram realizadas de acordo como descrito no ponto 5.6.1 e figura 6.

4.10 ENSAIO DE ELISA UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES, PROTEÍNAS QUIMÉRICAS E PEPTÍDEOS DE *L. (V.) braziliensis*

O primeiro passo consistiu na sensibilização da placa (100ng/100µL) com as proteínas recombinantes 1140 e 0750, das proteínas quiméricas PADRE e GPG, ou de cada um dos pools dos peptídeos P1 e P2, diluídos em tampão Carbonato/Bicarbonato 0,06 M pH 9,6. A placa então, foi incubada a 4°C por 18 horas em câmara úmida. Após incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 0,015 M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20. As amostras de soro foram diluídas em PBS 0,015 M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 e 10% de leite desnatado. As amostras de soros dos pacientes foram adicionados em uma diluição previamente padronizada para cada molécula testada. Foram testadas 4 diluições (1:50, 1:100, 1:450 e 1:900,). Por fim, a diluição escolhida para cada molécula foi aplicada para a avaliação das amostras.

Na etapa seguinte, foram adicionados 100 µL por poço das amostras de soro dos pacientes diluídos e a placa permaneceu em incubação por um período de 1 h em câmara úmida a 37°C, sendo posteriormente lavada como já descrito. Após lavagens foram adicionados 100 µL de anti- IgG humana cadeia gama específica conjugada à peroxidase, no título ideal para o teste (Calbioquem, título de 1/2500), sendo incubado

por mais 1h. A placa foi lavada mais 3 vezes, e por fim, 150 µL por poço do cromógeno (ácido 5-amino salicílico ou OPD) com o peróxido de hidrogênio foi adicionado. Após 30 minutos de incubação em câmara úmida à temperatura ambiente e na ausência de luz, houve uma etapa para estagnar a reação com 100µL por poço de ácido sulfúrico 1M. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm. Para cada ensaio foi adicionado um controle negativo e um positivo sensibilizadas com o extrato de antígenos solúveis do parasito na concentração de 500ng como controle interno da reação.

O limiar de reatividade (*cut-off*) de cada soro foi calculado levando-se em consideração a média aritmética das absorbâncias das diluições do controle negativo, acrescidos 2 vezes o desvio padrão.

4.11 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *L. (V.) braziliensis* PARA O TESTE DE ELISA

Para tal processo, foram utilizadas as formas promastigotas do parasito mantidas *in vitro*, como descritas anteriormente no item 5.8.

Os parasitos foram transferidos para tubos cônicos, e submetido a uma centrifugação de 400 X g por 10 min. Após essa etapa, foram realizadas 3 lavagens com uma solução salina tamponada, 1x e pH 7.2. O pellet formado foi ressuspenso com 750µL da solução tampão de lise branda e 250µL de inibidor de protease. Após essa etapa, o conteúdo foi repassado para um tubo microtubos de 1,5mL.

Para a etapa de lise celular, foram realizados sucessivos congelamentos e descongelamentos, no mínimo 6 cada, em nitrogênio líquido e banho-maria a 36°C, respectivamente. Posteriormente, foram adicionados 20µL da solução em uma lâmina de microscopia para verificar a viabilidade das células. Caso ainda houvessem células viáveis, eram realizadas mais etapas de congelamento e descongelamento. A solução final foi centrifugada a 10.000 X g a 4°C por 15 min e o sobrenadante (constituído por antígenos solúveis) foi coletado, e o pellet (constituído por antígenos insolúveis), ressuspenso em PBS. A fração solúvel foi quantificada com reagente de Bradford (10µL da suspensão antigênica, 200µL de Bradford e 790µL de água deionizada). Em seguida, a suspensão foi alíquotada em tubos menores e congelados a -80°C até o uso.

4.12 REAÇÃO DE ELISA UTILIZANDO FRAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *L. (V.) braziliensis*

O ensaio de ELISA foi realizado com o protocolo desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do IAM. A placa foi sensibilizada com 100µL do antígeno a 500ng/mL, previamente diluído em tampão Carbonato/Bicarbonato 0.06 M pH 9.6. A placa foi incubada a 4°C por 18 horas em câmara úmida. Após incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 0.015 M pH 7.2 contendo 0.05% de tween 20. Os soros foram diluídos em 1:900 de PBS 0.015 M pH 7.2 contendo 0.05% de tween 20 e 10% de leite em pó desnatado.

Em seguida, para cada placa foram adicionados padrões positivos e negativos com as mesmas diluições das amostras. Foram adicionados 100 µL por poço das amostras de soro dos pacientes diluídos e a placa foi incubada por 1 h em câmara úmida a 37°C e posteriormente lavada, como descrito anteriormente. Após essa etapa, foi realizada uma incubação de 1 hora com 100 µL de anti- IgG humana cadeia gama específica conjugada à peroxidase, no título ideal para o teste (Calbioquem, título de 1/2500). A placa foi lavada mais 3 vezes com PBS 0.015 M pH 7.2 contendo 0.05% de tween 20, como já descrito, e 150 µL por poço do cromógeno (ácido 5-amino salicílico ou OPD) com o peróxido de hidrogênio foram adicionados. Após 30 minutos de incubação em câmara úmida à temperatura ambiente e na ausência de luz, a reação foi parada com 100µL por poço de ácido sulfúrico 1M.

A leitura foi realizada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm. Todos os resultados da leitura da absorbância de cada amostra foram expressos em densidade óptica (DO). Em cada ensaio, as amostras foram testadas em triplicata, onde a média aritmética da DO da triplicata foi calculada e subtraída pela média do branco. Os resultados foram interpretados como descrito no item 5.10.

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DO DESEMPENHO DOS TESTES SOROLÓGICOS

Para análise do desempenho do teste de CF, foi definido o ponto de corte utilizado para diferenciar resultados positivos e negativos a partir dos valores de PFP. Foi realizada a construção da *Receiver Pperating Characteristic curve* – curva ROC. Ela foi construída adicionando os valores de sensibilidade no eixo y e o de

especificidade no eixo x. Utilizando a versão 7.0 do GraphPad Prism (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Todas as conclusões foram tomadas no nível de significância de 5%. Além disso, para os dois testes (Citometria de fluxo e ELISA) foram calculados sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivos e negativos. Por fim, as análises estatísticas foram calculadas usando a tabela de contingência 2 a 2 com IC binomial exato de 95%, usando o Software OpenEpi (Versão 2.3.1, Centros de Controle de Doenças, Atlanta, GA, EUA). Além disso, também foi mensurada a precisão global dos testes por meio da área sob a curva ROC (AUC) de acordo com Swets (1988). Os gráficos foram gerados pela versão 7.0 do GraphPad Prism (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA).

5 RESULTADOS

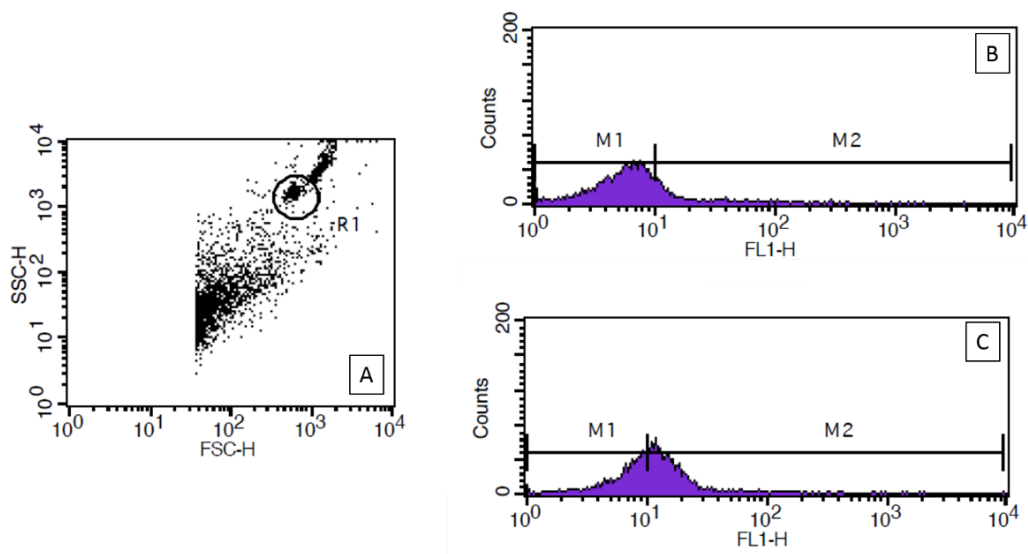
5.1 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *L. (V.) braziliensis* 0750 POR CITOMETRIA DE FLUXO

Inicialmente, um ensaio piloto foi realizado para otimizar e confirmar o acoplamento da proteína recombinante 0750 às esferas de poliestireno (*beads*) com 8 µm de tamanho.

A partir de um gráfico de tamanho x granulosidade foi possível delimitar a população de estudo (FIGURA 7). Após selecionar a população de interesse, foram construídos dois tipos de controles para otimizar as condições dos ensaios de CF. O primeiro foi construído a partir da proteína 0750 e as *beads*, visando confirmar o acoplamento. O segundo controle foi constituído pela proteína 0750 acoplada às *beads* e um anticorpo secundário anti-IgG humana marcado com o fluoróforo FITC (denominado controle do conjugado), na diluição de 1:400. Esse controle foi construído para avaliar a ocorrência de ligações inespecíficas no acoplamento, e avaliar a autofluorescência.

Por fim, como demonstrado nas figuras 7 B e C, os controles avaliados foram satisfatórios. Assim, foi possível confirmar o acoplamento e a ausência de ligações inespecíficas com o anticorpo secundário, uma vez que não houve deslocamento nos histogramas de fluorescência da região M1, considerada negativa, para a região positiva, M2.

Figura 7 – Gráfico para seleção da população e histograma do controle do acoplamento da proteína 0750 com as *beads* e o controle do conjugado.

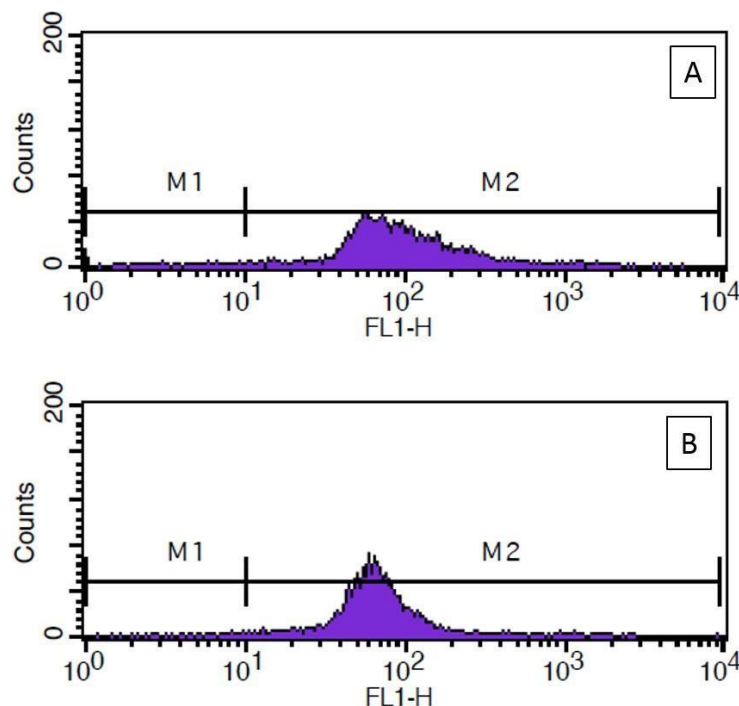


Fonte: Gráficos realizado pela autora no programa Cellquest.

Legenda: A: Seleção da população de estudo (proteína acoplada às *beads*) por tamanho e granulosidade por CF; B: Controle do acoplamento contendo apenas a proteína acoplada às *beads*; C: Controle do conjugado contendo a proteína acoplada às *beads* e o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado a FITC. M1 corresponde à região negativa e M2 à região positiva no histograma.

Após verificar os controles, foi possível avaliar a aplicabilidade da citometria na identificação e diferenciação de pacientes portadores de LT ativa e de indivíduos saudáveis. As amostras de ambos os grupos foram testadas em uma diluição seriada de 1:100 a 1:8000. Como resultado, em nenhuma das amostras e controles testados foi possível observar diferença dos títulos de anticorpos através da fluorescência. Como demonstrado nas Figuras 8 A e B, para ambos os grupos, seus respectivos histogramas apresentaram deslocamento para a região M2, correspondente a região positiva.

Figura 8 – Histograma do limiar de detecção da proteína recombinante 0750 para amostras positivas e negativas de LT.



Fonte: Histogramas realizados pela autora no programa Cellquest.

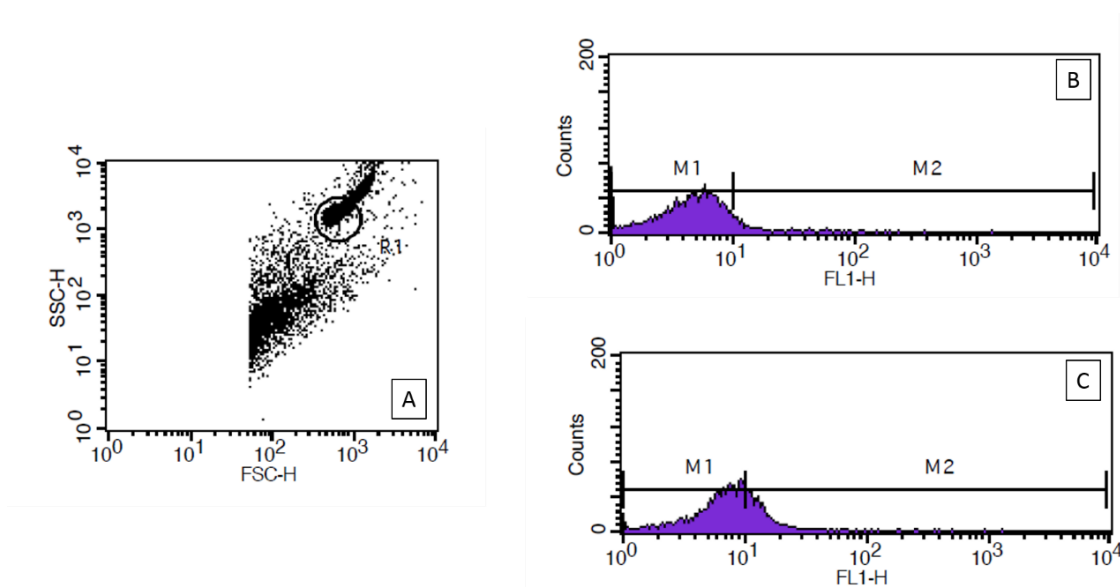
Legenda: A: Amostra de paciente portador de LT ativa; B: Amostra de indivíduo saudável. M1 corresponde à região negativa e M2 à região positiva no histograma.

5.2 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *L. (V.) braziliensis* 1140 POR CITOMETRIA DE FLUXO

A avaliação das proteínas recombinantes 1140, foi realizada como descrito anteriormente para a 0750.

A população foi delimitada e os controles foram construídos como descrito para a proteína 0750 (Figura 9A). A figura 9B ilustra o controle do acoplamento, onde é possível visualizar deslocamento de fluorescência no histograma. Em relação ao controle do conjugado para essa proteína, pode-se verificar na figura 9C a ausência de ligações inespecíficas dos componentes da reação.

Figura 9 – Gráfico para seleção da população e histograma do controle do acoplamento da proteína 1140 com as *beads* e o controle do conjugado.

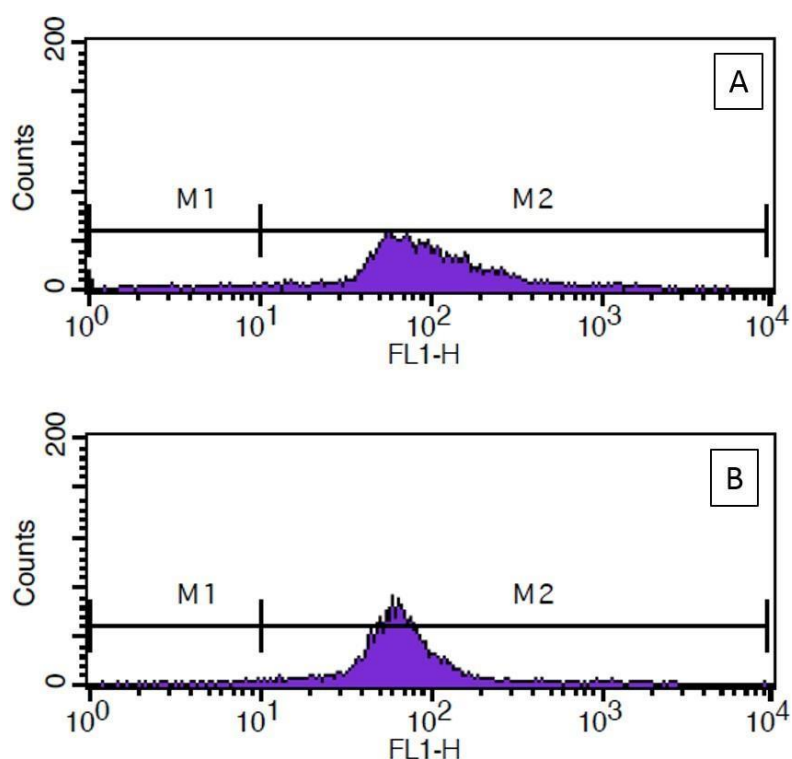


Fonte: Gráficos realizado pela autora no programa Cellquest.

Legenda: A: Seleção da população de estudo (proteína acoplada à *beads*) por tamanho e granulosidade no CF; B: Controle do acoplamento contendo apenas a proteína acoplada à *beads*; C: Controle do conjugado contendo a proteína acoplada à *beads* e o anticorpo secundário anti-IgG humana. M1 corresponde à região negativa e M2 à região positiva no histograma.

Após as análises dos controles foi avaliada a aplicabilidade da citometria, como realizado para a proteína 0750. Para esses ensaios, as amostras foram testadas com as mesmas diluições utilizadas anteriormente, variando 1:100 a 1:8000. Assim como a 0750, com a proteína 1140 não foi possível observar diferença entre os títulos das amostras testadas através do deslocamento de fluorescência nos histogramas (Figura 10 A e B).

Figura 10 – Histograma do limiar de detecção da proteína recombinante 1140 para amostras positivas e negativas.



Fonte: Histogramas realizados pela autora no programa Cellquest.

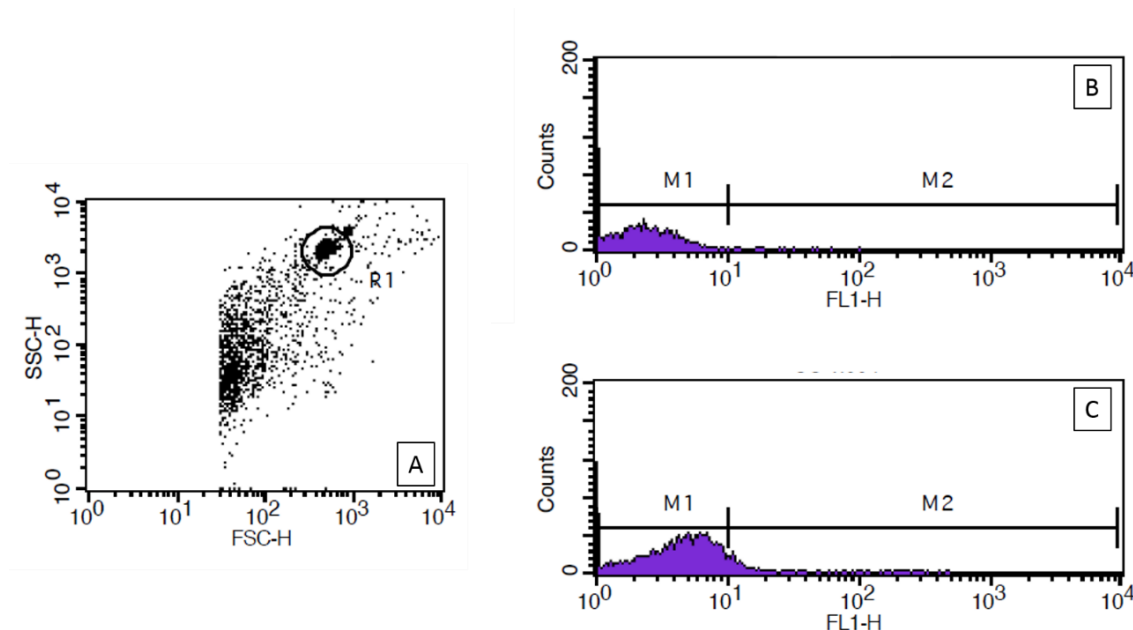
Legenda: A: Amostra de pacientes portadores de LT ativa; B: Amostra de indivíduo saudável. M1 corresponde à região negativa e M2 à região positiva no histograma;

5.3 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA PADRE DE *L. (V.) braziliensis* POR CITOMETRIA DE FLUXO.

A avaliação da proteína quimérica PADRE por citometria de fluxo foi realizada como descrito para as proteínas 0750 e 1140.

Novamente, a partir de um gráfico de tamanho x granulosidade a população foi delimitada (Figura 11A). Os controles do acoplamento e do conjugado também foram construídos para a proteína PADRE. As figuras 11 B e C confirmam a ausência de deslocamento de fluorescência no histograma, indicando novamente que não houve ligações inespecíficas.

Figura 11 – Gráfico para seleção da população e histograma do controle do acoplamento da proteína quimérica PADRE com as *beads* e o controle do conjugado.

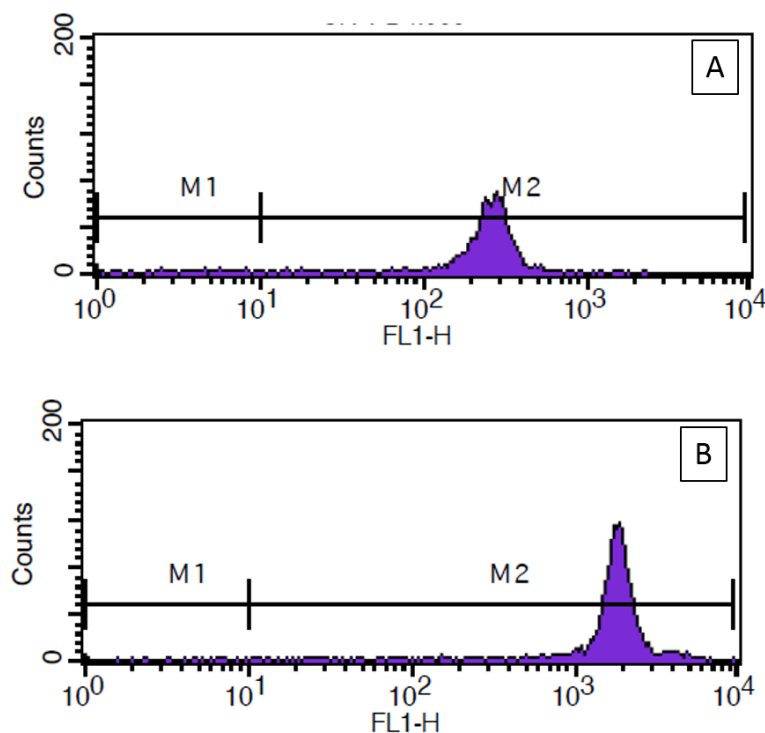


Fonte: Gráficos realizado pela autora no programa Cellquest.

Legenda: A: Seleção da população de estudo (proteína acoplada à *beads*) por tamanho e granulosidade no CF; B: Controle do acoplamento contendo apenas a proteína acoplada à *beads*; C: Controle do conjugado contendo a proteína acoplada à *beads* e o anticorpo secundário anti-IgG humana. M1 corresponde à região negativa e M2 à região positiva no histograma.

Na avaliação da aplicabilidade utilizando esta proteína, foram utilizadas as mesmas amostras de pacientes portadores de LT ativa e de indivíduos controles nas diluições, descritas anteriormente. A partir dos resultados observados com os histogramas das figuras 12 A e B, pode-se observar que as amostras dos pacientes não apresentaram um deslocamento da sua fluorescência superior ao do controle, como esperado no histograma.

Figura 12 – Histograma do limiar de detecção da proteína quimérica PADRE para amostras positivas e negativas.



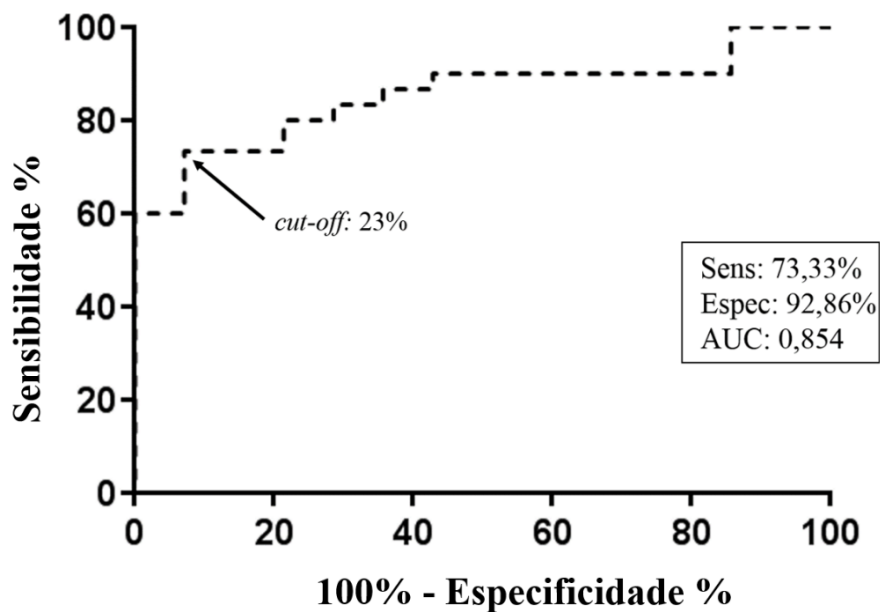
Fonte: Histogramas realizados pela autora no programa Cellquest.

Legenda: A: Amostra de pacientes portadores de LT ativa; B: Amostra de indivíduo saudável. M1 corresponde à região negativa e M2 à região positiva no histograma.

5.4 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO CONVENCIONAL PARAPACIENTES PORTADORES DE LT

O ensaio convencional de citometria de fluxo utilizando como antígeno as formas promastigotas fixadas do parasito *L. (V.) braziliensis*, foi realizado com o objetivo de comparar o desempenho com os outros testes avaliados no presente estudo.

Inicialmente, foi calculado o *cut-off* para o teste a partir da construção da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), utilizando valores de PPFP (Porcentagem de parasitos fluorescentes positivos) dos ensaios obtidos com amostras de indivíduos saudáveis. A curva ROC demonstrou que, para o teste de CF convencional, o *cut-off* ideal é de 23%. (FIGURA 13).

Figura 13 – Curva ROC para determinar o cut-off para o teste de CF

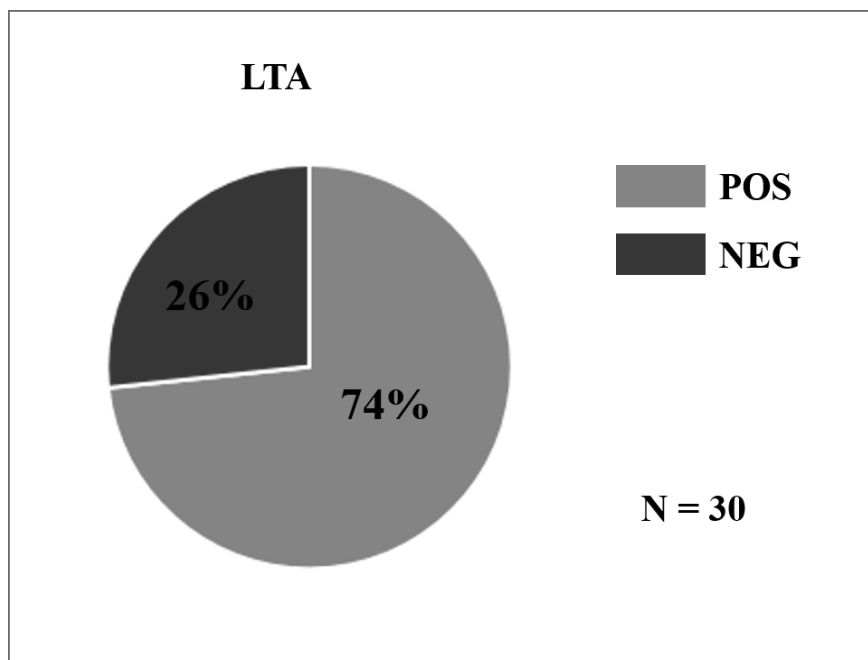
Fonte: Autor (2021).

Legenda: Sens: Sensibilidade; Espec: Especificidade; AUC: Área sob a curva.

Para esses ensaios, as condições foram padronizadas anteriormente, considerando as amostras de pacientes portadores de LT ativa na diluição de 1:256, região de reatividade previamente padronizada, e o anticorpo secundário o anti-IgG humana conjugado a FITFC, diluído em 1:200.

A partir do *cut-off* de PPFP de 23%, o teste identificou 74% de positividade nas 30 amostras (22/30) (FIGURA 14) de LT avaliadas. (FIGURA 14).

Figura 14 – Resultados do teste de CF para pacientes portadores de LT.



Fonte: Autor (2021).

Legenda: Pos – positivo; Neg- negativo; N – número de amostras.

5.5 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA 0750 NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA.

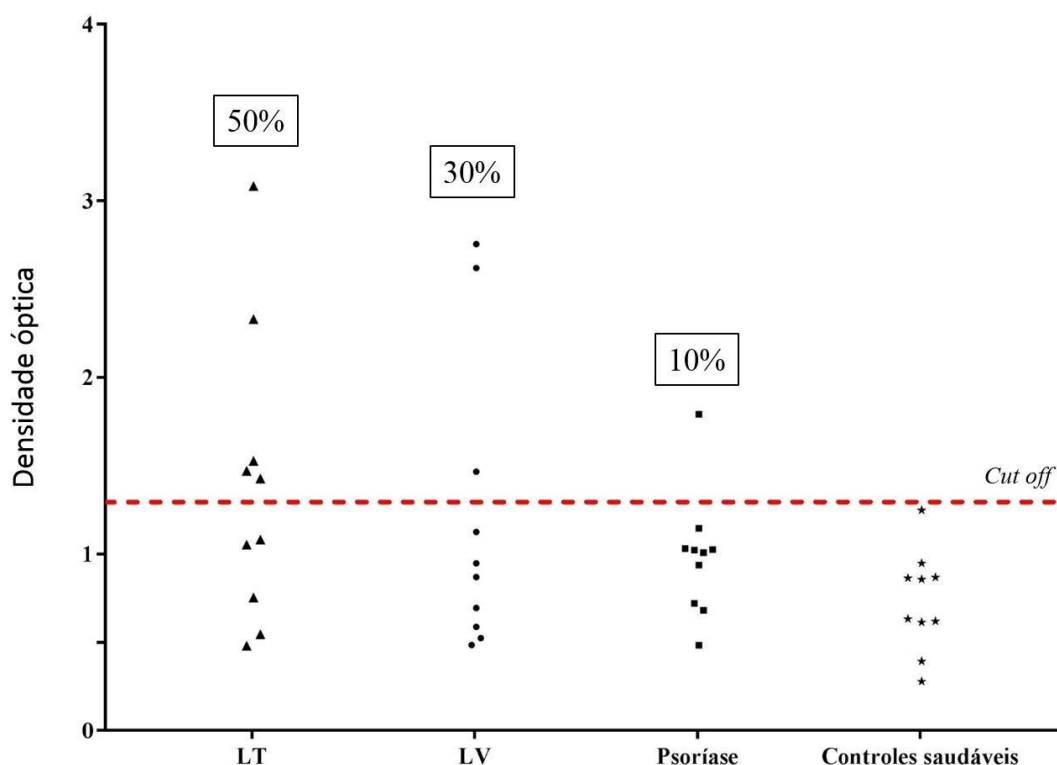
Os ensaios de ELISA utilizando a proteína 0750 foram realizados com o intuito de avaliar o desempenho do método na identificação dos pacientes portadores de LT ativa, como também no diagnóstico diferencial.

As condições para o ensaio foram otimizadas previamente pelo grupo. Para o teste de ELISA, a proteína 0750 foi utilizada na concentração de 500ng. Em relação às amostras, foram utilizadas amostras sabidamente positivas de pacientes portadores de LT (N=10), de pacientes portadores de Leishmaniose Visceral (N=30), e de Psoríase (N=10). Todas as amostras foram diluídas na concentração de 1:450, padronizada previamente.

O limiar de reatividade do ensaio foi calculado a partir de dez amostras sabidamente negativas. O resultado foi expresso a partir da densidade óptica (DO) das amostras, apresentando um valor de 1,299. Sendo assim, apenas amostras que apresentaram um valor de DO acima de 1,299 foram consideradas positivas para o teste.

Das amostras avaliadas, houve positividade de 50% (5/10) para LT, 30% para LV (3/10) e 10% (1/10) para PSO (FIGURA 15).

Figura 15 – Aplicabilidade da proteína 0750 para diagnóstico diferencial da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.6 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA 1140 NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA.

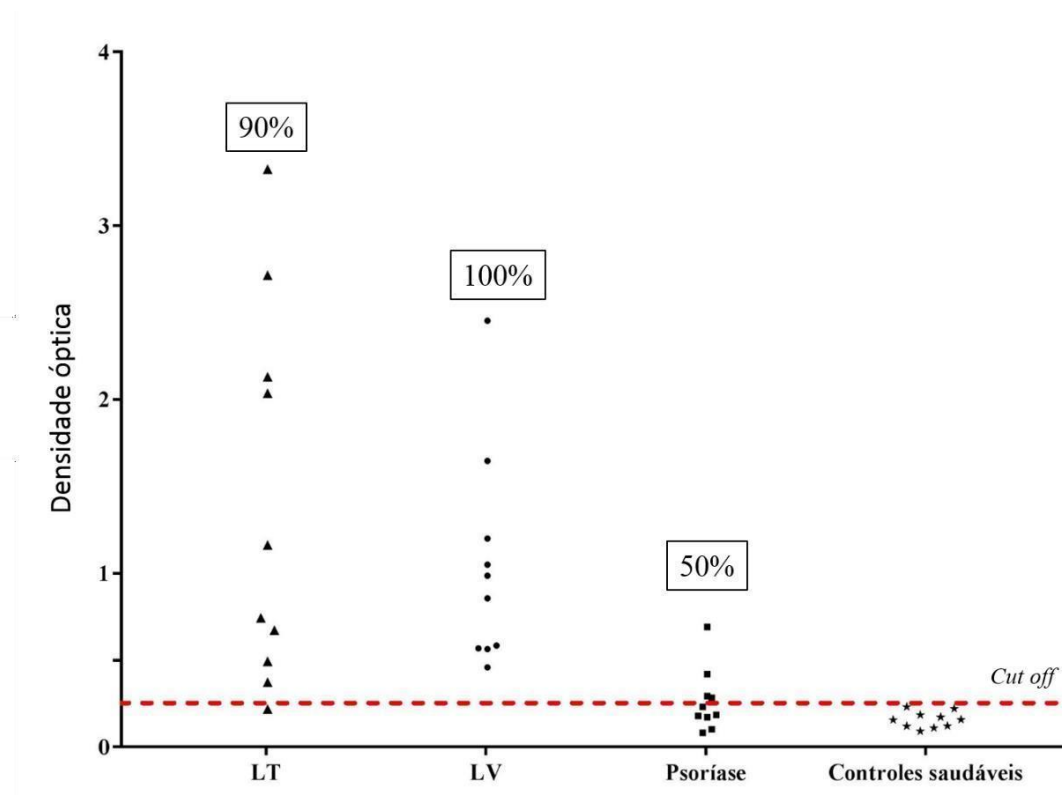
Da mesma forma que foi descrita para a proteína 0750, foi utilizada a proteína 1140 com o mesmo objetivo.

As condições do ensaio foram otimizadas, considerando-se a proteína 1140 na concentração de 200ng. As mesmas amostras selecionadas para a proteína anterior foram testadas e também foram diluídas de 1:450.

O limiar de reatividade do ensaio foi calculado como descrito anteriormente (item 6.5). Para tal foram selecionadas dez amostras negativas e o resultado foi expresso a partir da densidade óptica (DO). Como resultado, para a 1140 foi observado a DO de 0,250. Amostras acima dessa DO foram consideradas positivas para o teste.

Das amostras avaliadas, houve positividade de 90% (9/10) para LT, 100% para LV (10/10) e 50% (5/10) para PSO (FIGURA 16).

Figura 16 – Aplicabilidade da proteína 1140 para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.7 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA PADRE NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA.

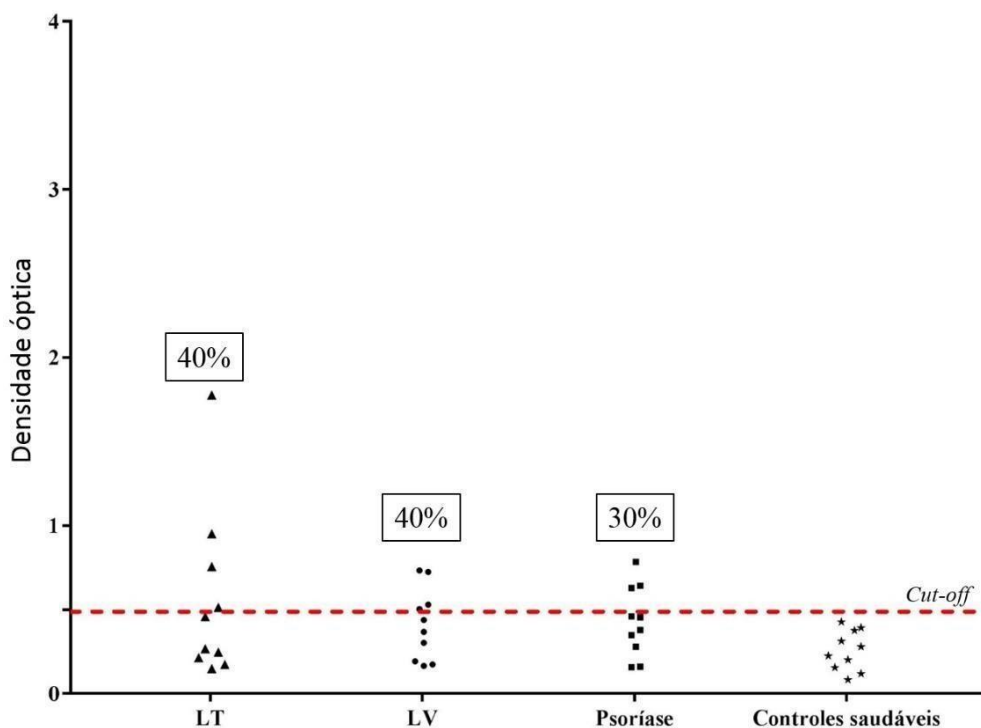
A proteína PADRE foi utilizada com os mesmos objetivos descritos anteriormente para a 0750 e a 1140.

As condições foram otimizadas, considerando a proteína PADRE na concentração de 600ng. As amostras selecionadas para os ensaios anteriores foram diluídas a 1:450.

O limiar de reatividade do ensaio foi calculado como descrito nos itens 6.5 e 6.6. Foram selecionadas dez amostras negativas e o resultado expresso a partir da densidade óptica (DO). Como resultado, para a PADRE foi observado a DO de 0,496. Amostras acima dessa DO foram consideradas positivas para o teste.

Das amostras avaliadas, houve positividade de 40% (4/10) para LT, 40% para LV (4/10) e 30% (3/10) para PSO (FIGURA 17).

Figura 17 – Aplicabilidade da proteína quimérica PADRE para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.



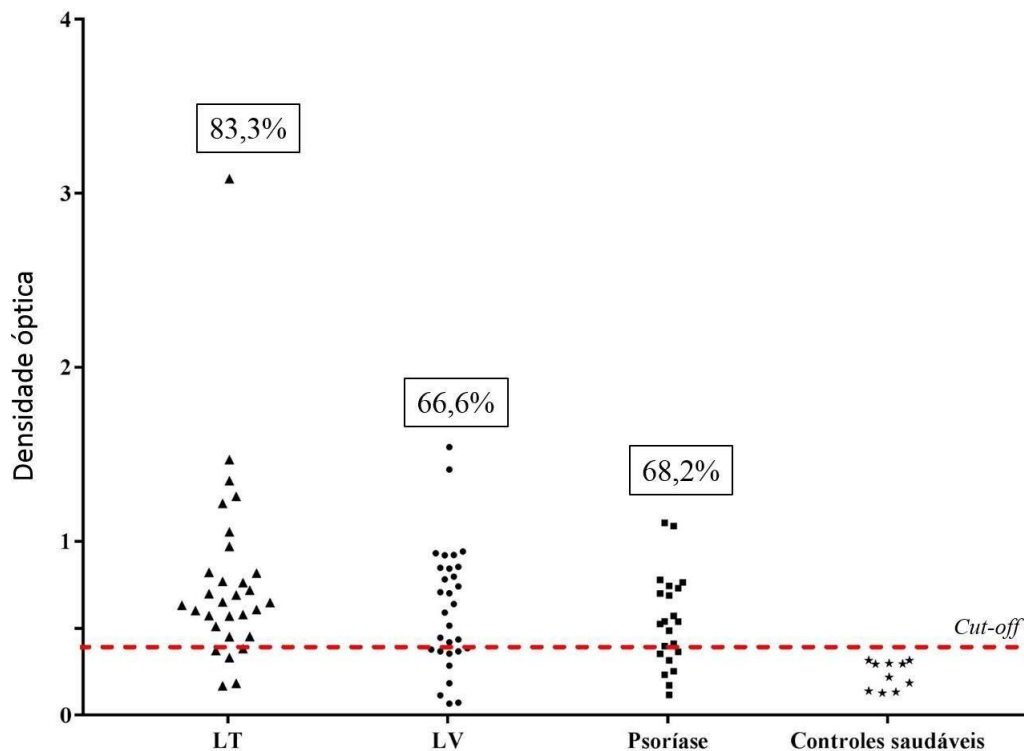
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.8 AVALIAÇÃO DO POOL ESPECÍFICO (P1) DE PEPTÍDEOS DE *L. (V.) braziliensis* NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA.

O pool de peptídeos específicos (P1) foi utilizado como descrito para as proteínas anteriores. As condições foram otimizadas, considerando o pool na concentração de 100ng. As amostras selecionadas para os ensaios anteriores foram diluídas de 1:450.

O limiar de reatividade do ensaio foi calculado como já descrito (itens 6.5, 6.6 e 6.7). Como resultado, foi observado a DO de 0,391. Amostras acima dessa DO foram consideradas positivas para o teste. Das amostras avaliadas, houve positividade de 83,3% (25/30) para LT, 66,6% (20/30) para LV e 68,2% (15/22) para PSO (FIGURA 18).

Figura 18 – Aplicabilidade do pool de peptídeos específicos (P1) para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

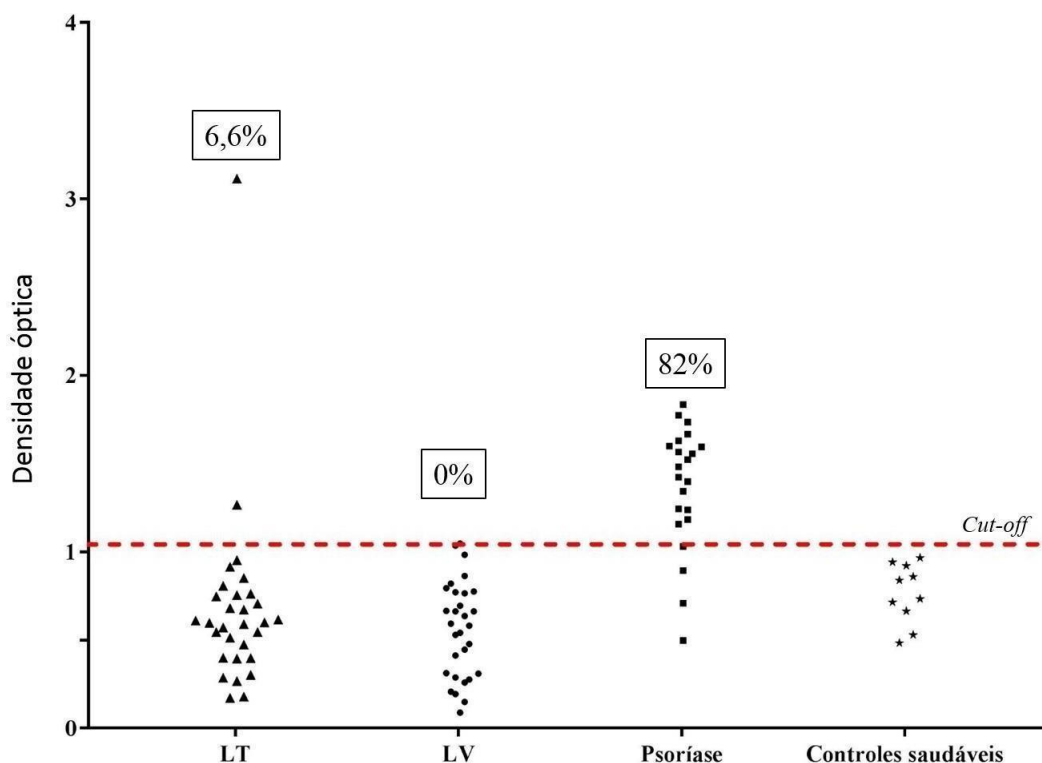
5.9 AVALIAÇÃO DO POOL INESPECÍFICOS (P2) DE PEPTÍDEOS DE *L. (V.) braziliensis* NA IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE LT E NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR ELISA.

O pool de peptídeos específicos (P2) foi utilizado como nos tópicos anteriores. Para esses ensaios ele foi utilizado na concentração de 100ng e as amostras selecionadas foram diluídas de 1:450.

O limiar de reatividade do ensaio foi calculado como já descrito (itens 6.5, 6.6, 6.7 e 6.8). Como resultado, foi observado a DO de 1,104. Amostras acima dessa DO foram consideradas positivas para o teste.

Das amostras avaliadas, houve positividade de 6,6% (2/30) para LT, 0% (0/30) para LV e 82% (18/22) para PSO (FIGURA 19).

Figura 19 – Aplicabilidade do pool de peptídeos inespecíficos (P2) para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar para o teste de ELISA.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.10 ENSAIO DE ELISA CONVENCIONAL UTILIZANDO A FRAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DA *L. (V.) braziliensis* PARA VERIFICAÇÃO DE REATIVIDADE CRUZADA

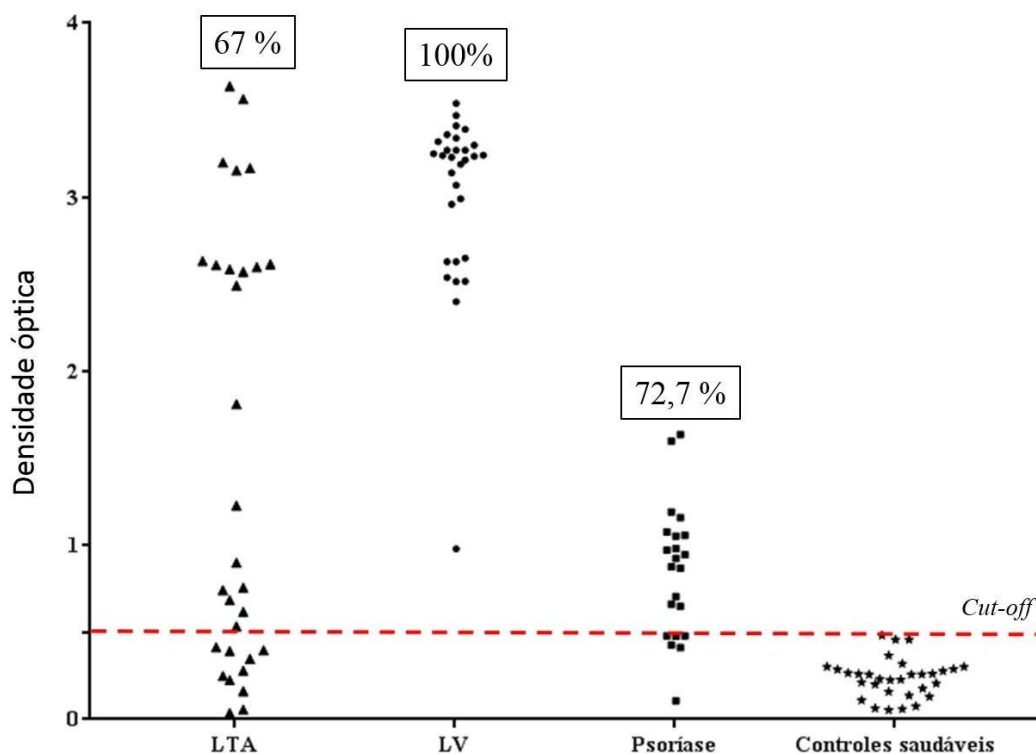
Os ensaios convencionais de ELISA foram realizados com o intuito de avaliar a presença de reatividade cruzada dentro do teste para o diagnóstico da LT, a fim de comparar o desempenho com as moléculas utilizadas no trabalho.

Sendo assim, foi utilizado a fração de antígenos solúveis do parasito *L. (V.) braziliensis* na concentração de 500ng, previamente otimizado. Conforme realizado anteriormente, foram testadas amostras de portadores de LT (N=30), LV (N=30) e PSO (N=22), todas na diluição de 1:900.

Para a análise dos resultados foi utilizado o mesmo raciocínio de todos os testes de ELISA com as outras moléculas descritas anteriormente, ou seja, a D.O para esse ensaio foi de 0,535.

Sendo assim, do total de amostras testadas, 67% (20/30) foram consideradas positivas para LT, 100% (30/30) para as amostras de LV e 72,7% (16/22) para PSO (FIGURA 20).

Figura 20 – Reatividade cruzada para o teste convencional de ELISA com a fração de antígenos solúveis da *L (V.) braziliensis*.



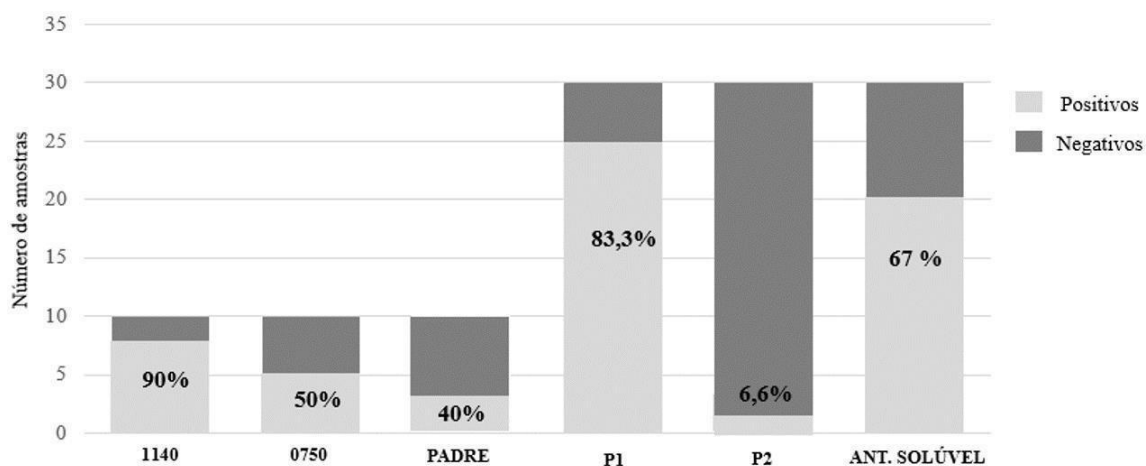
Fonte: Autor (2021).

5.11 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DOS TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

No presente trabalho o teste de ELISA foi realizado utilizando cinco diferentes moléculas obtidas *in silico* em trabalhos anteriores (TAVARES D. H. C., 2017; SILVA. R. F., 2016; OLIVEIRA, B.C, 2020).

Todas as moléculas foram avaliadas diante da capacidade de detectar pacientes com LT ativa. Os resultados obtidos foram comparados com o resultado do teste convencional do ELISA, que é utilizado atualmente a fração de antígenos solúveis do parasito. Os resultados estão resumidos na figura 21, onde de todas as moléculas testadas, a proteína recombinante 1140 e o pool de peptídeos específicos (P1), demonstraram uma melhor capacidade na detecção dos pacientes de LT, semelhante ao observado para a forma convencional do teste.

Figura 21 – Comparação da porcentagem de positivos para as amostras de LT entre as diferentes moléculas obtidas *in silico* e a forma convencional do teste de ELISA



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Além disso, todos os resultados obtidos para o teste de ELISA foram comparados com a forma convencional da CF. Para tal, foram calculadas a sensibilidade e especificidade de cada um (TABELA 2). Esses resultados demonstraram que os resultados variaram para cada molécula. Dentre todas as testadas, a proteína 1140 e o pool de peptídeos específicos (P1) para o teste de ELISA, apresentaram os maiores índices de sensibilidade, de 90% e 83,3% para a proteína 1140 e o pool P1, respectivamente.

Tabela 2 – Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos dos testes de ELISA e CF.

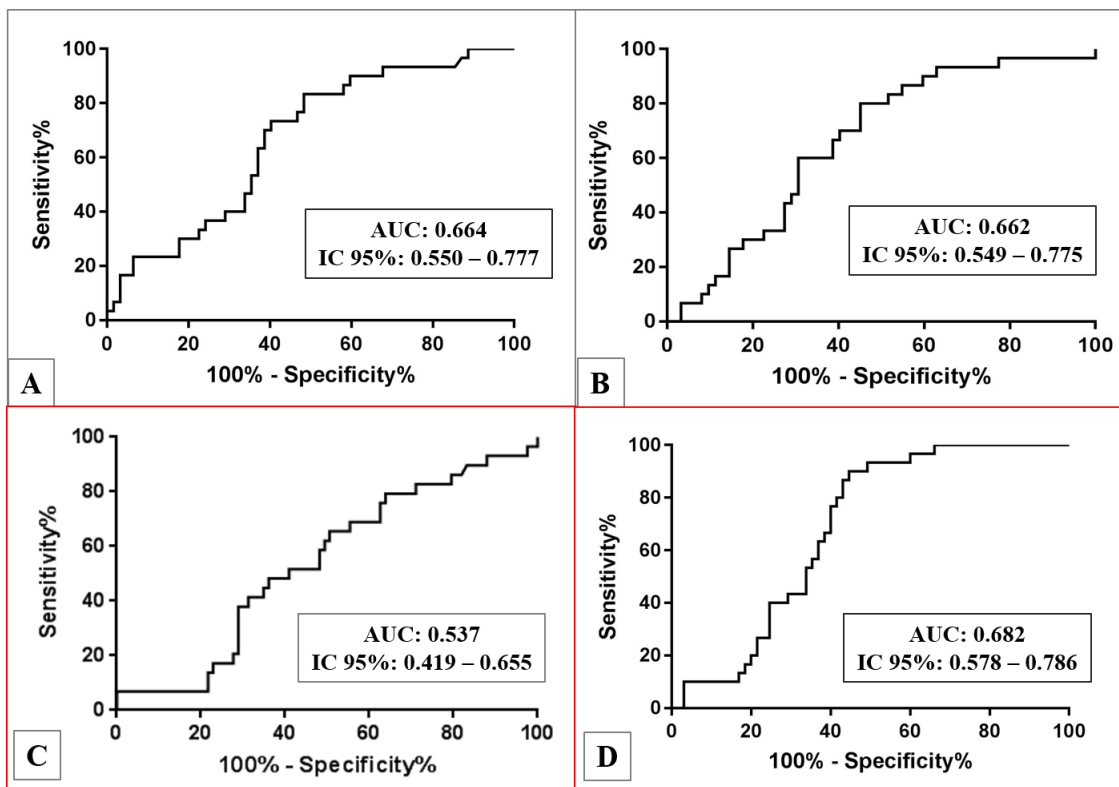
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Peptídeo Pool 1 (95% IC)	83.3% (66.44 - 92.66)	43.55% (31.94 - 55.91)	41.67% (30.06 - 54.27)	84.38% (68.25-93.14)
Peptídeo Pool 2 (95% IC)	6.67% (1.84- 21.32)	70.97% (58.71- 80.78)	10% (2.787- 30.1)	61.11% (49.56-71.53)
Proteína 1140 (95% IC)	90% (59.58-98.21)	50% (33.15-66.85)	37.5% (21.16-57.29)	93.75% (71.67-98.89)
Proteína 0750 (95% IC)	50% (23.66-76.34)	86.67% (70.32-94.69)	55.56% (26.66-81.12)	83.87% (67.37-92.91)
Proteína PADRE (95% IC)	40% (16.82-68.73)	76.67% (59.07-88.21)	36.36% (15.17-64.62)	79.31% (61.61-90.15)
ELISA - Antígenos Solúveis (95% IC)	66.67% (48.78-80.77)	25.81% (10.55-51.88)	30.3% (20.55-42.22)	61.54% (42.53-77.57)
Citometria de Fluxo Convencional (95% IC)	73.33% (55.55-85.82)	22.58% (13.96-34.41)	31.43% (21.76-43.03)	63.64% (42.95-80.27)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: IC – Intervalo de confiança; VPP- Valores preditivos positivos; VPN – Valores preditivos negativos.

Por fim, para avaliar o desempenho geral e a reatividade cruzada de cada teste frente às amostras dos pacientes de LT e os controles saudáveis (LV e PSO), foram construídas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) comparando os resultados do ELISA e CF convencionais (FIGURAS 22,23 e 24). Analisando cada curva ROC, observa-se que a área sob a curva (ASC) do ELISA utilizando a proteína 1140 (ASC=0,810; IC_{95%}= 0,666-0,953) foi superior em relação as outras moléculas, e também as formas convencionais dos testes.

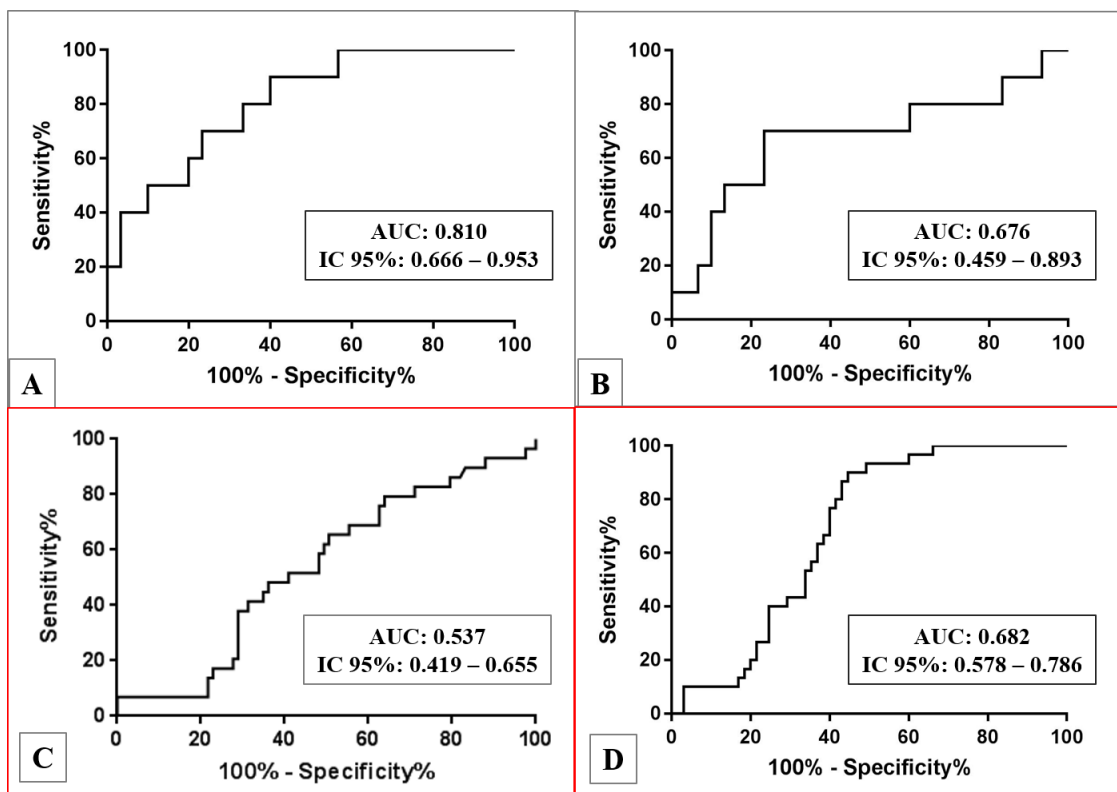
Figura 22 – Comparação entre as curvas ROC dos pools de peptídeos P1 e P2 por ELISA e a CF.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: A – Curva ROC do teste de ELISA utilizando o pool de peptídeos P1; B - Curva ROC do teste de ELISA utilizando o pool de peptídeos P2; C- Curva ROC do teste de ELISA utilizando a fração de antígenos solúveis da *L. (V.) braziliensis*; D- Curva ROC da Citometria de fluxo utilizando formas promastigotas da *L. (V.) braziliensis*.

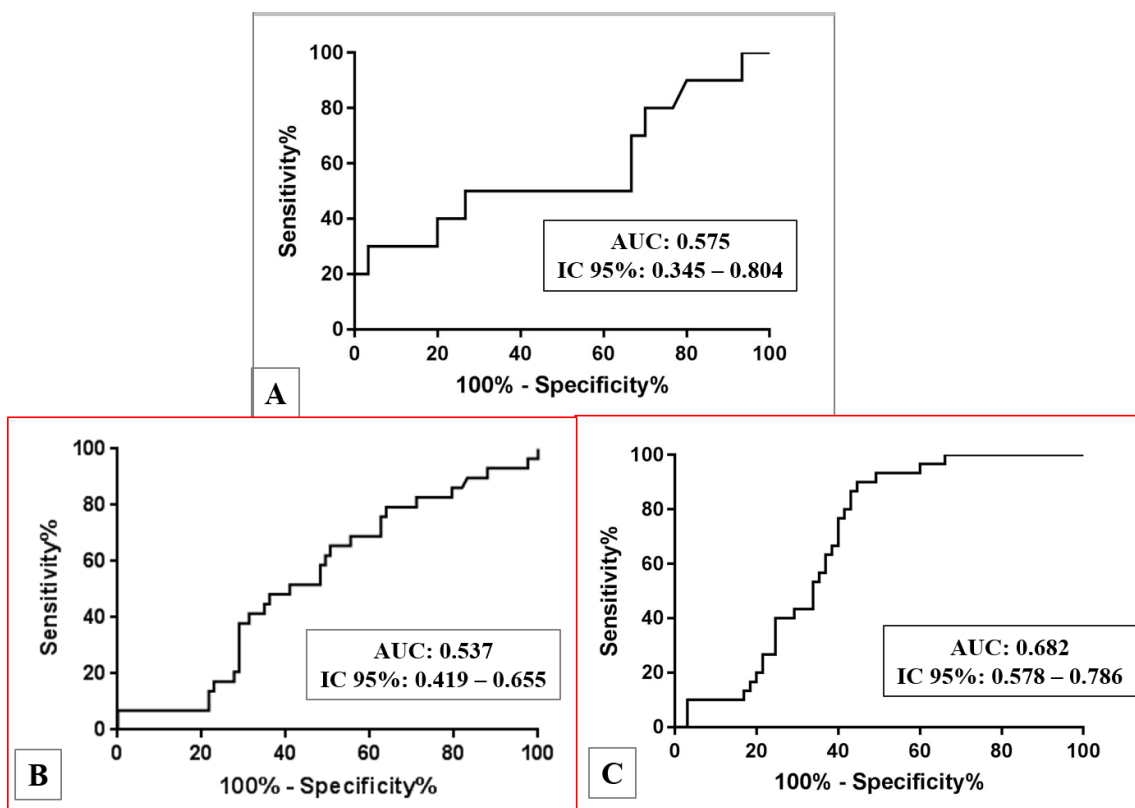
Figura 23 – Comparação entre as curvas ROC das proteínas recombinantes 1140 e 0750 por ELISA e CF.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: A – Curva ROC do teste de ELISA utilizando a proteína recombinante 1140; B - Curva ROC do teste de ELISA utilizando a proteína recombinante 0750; C- Curva ROC do teste de ELISA utilizando a fração de antígenos solúveis da *L. (V.) braziliensis*; D- Curva ROC da Citometria de fluxo utilizando formas promastigotas da *L. (V.) braziliensis*.

Figura 24 – Comparação entre as curvas ROC da proteína quimérica PADRE por ELISA e CF.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: A – Curva ROC do teste de ELISA utilizando a proteína quimérica PADRE; B- Curva ROC do teste de ELISA utilizando a fração de antígenos solúveis da *L. (V.) braziliensis*; C- Curva ROC da Citometria de fluxo utilizando formas promastigotas da *L. (V.) braziliensis*.

6 DISCUSSÃO

A LT é uma das doenças tropicais mais importantes e complexas da atualidade e, mesmo nessa condição, as técnicas para diagnóstico disponíveis estão longe do ideal, uma vez que até o momento não há um método reconhecido como o padrão-ouro (DE VRIES *et al*, 2015; BRASIL, 2017; MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2017). Em seu trabalho, Noya *et al* (2003) defenderam que o elemento chave para um bom desempenho em um teste de diagnóstico sorológico é o seu antígeno.

Nesse contexto, o uso de abordagens *in silico* para identificação de moléculas específicas do parasito, visa aprimorar as metodologias convencionais (FLOWER; DOYTCHINOVA, 2002; THOMAZ-SOCCOL, 2018). Na perspectiva de minimizar as limitações existentes no diagnóstico da LT, o presente trabalho buscou avaliar a utilização de diferentes moléculas, identificadas *in silico* em trabalhos anteriores do grupo (SILVA. R. F., 2016; TAVARES D. H. C., 2017; OLIVEIRA, B.C., 2020), nos testes sorológicos disponíveis.

Em relação aos resultados da CF, foi observado que o acoplamento de todas as proteínas (0750, 1140 e PADRE) com as esferas de poliestireno foi realizado com sucesso. A possibilidade de utilizar esferas acopladas com moléculas específicas do parasito na abordagem da CF, já foi relatada em trabalhos como os de SOUSA, S. *et al*. (2013) e KER, H. *et al*, (2019) para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina. Nesses trabalhos, foi observada a possibilidade de empregar proteínas recombinantes dentro da metodologia da CF para a detecção de anticorpos, melhorando o desempenho.

Resultado similar foi descrito no trabalho de TAVARES D. H. C. (2017). O autor identificou uma proteína recombinante específica da espécie *L. infantum* e conseguiu acoplar essa proteína as esferas de poliestireno semelhantes às utilizadas no presente estudo. Como já discutido por ROCHA *et al*, 2002 e SILVESTRE, R., *et al*, 2009, a dependência da manutenção de cultura para uso dos parasitos fixados no teste representa um custo maior para o método e não exclui a reatividade cruzada. Sendo assim, a possibilidade da substituição do parasito fixado por uma proteína recombinante é uma ideia promissora.

Quando as proteínas 0750, 1140 e PADRE foram avaliadas, não foi possível diferenciar os títulos de anticorpos entre amostras de pacientes e amostras do grupo controle. Embora otimizações do protocolo ainda devam ser realizadas e levando-se em

consideração que as amostras dos soros foram bem selecionadas, sugere-se que esse fato pode ter ocorrido por possíveis ligações inespecíficas entre as esferas, os anticorpos secundários e outros componentes da resposta imune presentes nas amostras. A abordagem de acoplamento na CF teve êxito em outros trabalhos de diagnóstico de outras doenças como leishmanioses visceral humana e canina, para alguns tipos de vírus e malária (YANG, *et al.*, 2008; SOUSA, S. *et al.* 2013; ROGIER, *et al.*, 2017; PARSA, *et al.*, 2018; KER, H. *et al.*, 2019). Para LT, essa abordagem foi explorada no trabalho de PEDRAL-SAMPAIO *et al.*, (2016) através do acoplamento de esferas com a fração solúvel dos antígenos da *L (V.) braziliensis*.

Com o intuito de avaliar o desempenho, sobretudo em relação a sensibilidade e especificidade, foram realizados ensaios de ELISA com as moléculas descritas anteriormente. Além disso, para comparar a acurácia de cada método, foram realizados ensaios de ELISA e CF convencionais, utilizando a fração de antígenos solúveis e a forma fixada do parasito *L (V.) braziliensis*.

Para o ELISA, a otimização de ambas as proteínas recombinantes (0750 e 1140) foi realizada com êxito. Quando testada frente às amostras de pacientes de LT ativa, a proteína 1140 demonstrou uma maior sensibilidade (90%) para detecção dessas amostras, em comparação à proteína 0750 (50%). Essas proteínas foram identificadas por TAVARES D. H. C. (2017) que, a partir de ferramentas de bioinformática, analisou o proteoma predito da *L. (V.) braziliensis* e identificou epítomos imunogênicos e específicos para células B. Ambas são proteínas derivadas de regiões específicas do DNA do parasito que possuem um maior número de epítomos.

A sensibilidade observada para essas proteínas corrobora com outros estudos de proteínas específicas do gênero *Leishmania*, como por exemplo, as proteínas recombinantes de *L(V.) braziliensis* já descritas: a rK108, rLbHyM, rLHHs, rHSPH83, RA2, rLb6H, rLb8E e LbK39 (CELESTE, B. J. *et al.*, 2004; ABASS, E. *et al.*, 2013; SATO, C. M. *et al.*, 2017; LIMA, M. P. *et al.*, 2017; DIAS, D. S. *et al.*, 2018; DE SOUZA, *et al.* 2019). A implementação de cada uma dessas moléculas foi capaz de elevar a acurácia do teste de ELISA

A avaliação da sensibilidade do teste de ELISA, utilizando os pools de peptídeos, demonstrou que o pool P1 foi expressivamente mais sensível (83.3%) em comparação com o P2 (6.67%). Esses resultados corroboram com análises anteriores sobre a

imunogenicidade dessas moléculas. O pool P1 é composto por 5 sequências peptídicas que em testes *in vitro* apresentaram um perfil de resposta específica ao estimular as células de pacientes portadores de LT. Já o pool P2, é composto por outras 5 sequências. Essas apresentaram um perfil inespecífico, estimulando as células de do grupo de LT e as controles (OLIVEIRA, B.C, 2020; FREITAS-E-SILVA, R. DE *et al.*, 2020). Dessa forma, a junção dos peptídeos que compõem o pool P1, se mostrou capaz de diferir os grupos de amostras de maneira mais eficiente.

A idéia do uso de peptídeos como antígenos para diagnóstico já foi abordada em alguns trabalhos (CARMONA *et al.*, 2012; LAGE *et al.*, 2016), apontando que seu uso são opções viáveis e vantajosas. Essas moléculas, quando comparadas com a produção de proteínas, são mais simples, fáceis e baratas de produzir, com possibilidade de uso em larga escala, e em muitos casos mais sensíveis e específicas. No cenário da LT, Link *et al.* (2017) conseguiram identificar peptídeos de *L(V.) braziliensis* para o diagnóstico utilizando como método o teste de ELISA. O trabalho comparou o desempenho desses peptídeos em relação à sensibilidade e especificidade, utilizando-os juntos em um pool ou individualmente. A sensibilidade obtida com o pool foi de 79% e a especificidade de cada um dos peptídeos variou entre 78% e 100%. Trabalhos como esse corroboram com os resultados de sensibilidade observados para o pool de peptídeos P1. Destaca-se ainda, a possibilidade de avaliar a atividade diagnóstica individual de cada peptídeo que o constitui.

Para o teste de ELISA, a proteína quimérica PADRE demonstrou uma sensibilidade de 40%. Quando comparada com às proteínas 1140, 0750, e com o pool de peptídeos P1, ela foi a menos sensível; porém, demonstrou resultados superiores aos obtidos para o pool de peptídeos P2. Uma hipótese para o que foi observado está relacionada ao fato de que essa proteína quimérica é derivada das dez sequências peptídicas, identificadas no trabalho anterior de SILVA. R. F. (2016) (OLIVEIRA, B.C, 2020). Desse modo, as sequências de peptídeos do pool P1, que demonstraram resultados satisfatórios, quando unidas com as sequências do pool P2 para construção da proteína final PADRE, acabaram por apresentar uma perda na sensibilidade. Isso pode ser atribuído ao tipo de resposta inespecífica observada para o P2, reduzindo a habilidade de distinguir os grupos de pacientes e controles testados.

A sensibilidade encontrada para o teste de ELISA convencional utilizando a fração de antígenos solúveis da *L. (V.) braziliensis*, corrobora com o descrito na literatura,

ainda visto como um teste sensível, porém com resultados variáveis (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; PEDRAL- SAMPAIO *et al.*, 2016). Os resultados de trabalhos anteriores, como os de ROCHA *et al.*, 2006, PISSINATE *et al* 2008, OLIVEIRA *et al*, 2013, PEDRAL-SAMPAIO *et al* 2016 e MENDES, A. P. O. *et al.* (2019) reforçam a CF como técnica mais sensível em comparação ELISA. Essa maior sensibilidade, atrelada em parte à robustez do equipamento e também ao uso de promastigotas fixadas, permitem a exposição de antígenos da membrana do parasito (ANDRADE *et al.*, 1988; CHIARAMONTE *et al.*, 1996; TAVARES *et al.* 2003; OLIVEIRA *et al.* 2013; PEDRAL- SAMPAIO *et al.*, 2016).

Entretanto, os resultados de especificidade obtidos com o uso da fração de antígenos solúveis do parasito no ELISA (25.81%), e com uso dos parasitos fixados na CF (22.58%), mostram uma deficiência nessa questão (LEMOS *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2009). Como discutido por CABALLERO *et al* (2007) e ARONSON *et al.* (2017), esses testes ainda estão sujeitos a ligações cruzadas com antígenos de organismos semelhantes, principalmente outros tripanossomatídeos, resultando em falso-positivos. Essa problemática impulsiona ainda mais os avanços dos estudos *in silico* para identificação de diversos novos potenciais antígenos para o diagnóstico da LT (ZANETTI *et al.* 2019).

Sendo assim, foram incluídas amostras de pacientes portadores de Leishmaniose Visceral e Psoríase para a realização do teste ELISA utilizando cada uma das moléculas (proteínas 0750,1140 e PADRE e pools de peptídeos P1 e P2). Ressalta-se que as moléculas que apresentaram uma maior especificidade, as proteínas 0750 (86.67%), PADRE (76.67%) e o pool de peptídeos P2 (70.97%) demonstraram os menores valores de sensibilidade. Uma das possíveis razões seria o fato de que algumas proteínas e peptídeos sintéticos podem perder seu potencial de imunorreação, dependendo da forma que é construída e expressa. Alguns sistemas de expressão acabam por não oferecer algumas modificações pós-tradução, e isso resulta em modificações no produto final (DE SOUZA, *et al.* 2019).

Toda essa idéia deve ser levada em consideração, visto que a ligação entre um antígeno e um anticorpo é um complexo processo bioquímico. Além da necessidade do reconhecimento específico de sequências, é preciso também o reconhecimento estrutural entre as moléculas (PINGPING S *et al* 2013). Desse modo, provavelmente essas moléculas já apresentam uma dificuldade de reagir e reconhecer os antígenos específicos da *L. (V.) braziliensis*. Baseados nos resultados de sensibilidade, as

proteínas 0750 e PADRE, se mostraram fracamente capazes de reagir e reconhecer os pacientes de LT ativa. Assim, esse perfil permaneceu quando as mesmas foram desafiadas com as amostras de reatividade cruzada, resultando em uma maior especificidade.

Portanto, a partir da análise dos resultados, foi observado que para a maioria das moléculas (proteínas 0750, 1140 e PADRE), as amostras de LV foram as que apresentaram o maior índice de reação cruzada. Isso pode ser explicado devido à relação filogenética entre as espécies causadoras, que são pertencentes ao mesmo gênero *Leishmania*. Dessa forma, esses organismos podem compartilhar diversos elementos e moléculas, que acabam se ligando de maneira cruzada com os anticorpos, gerando os resultados falso-positivos (ROMERO *et al.*, 2005).

Outro fator a ser discutido, é que no processo de análises *in silico*, um dos parâmetros foi a seleção de proteínas da *L. (V.) braziliensis* conservadas entre *L. major* e *L. infantum* (SILVA. R. F. (2016); TAVARES D. H. C. (2017). Isso explica a possibilidade de reação cruzada com as amostras. Além disso, existe um fator chave na imunopatogênese da LV que difere da LT. As infecções causadas por *L. infantum* levam a uma grande produção de anticorpos, ao contrário de infecções por *L. (V.) braziliensis* (ROMERO *et al.*, 2005; GOTO; LINDOSO, 2010). Assim, as amostras com uma grande quantidade de anticorpos, podem facilmente se ligar de maneira cruzada com as moléculas.

Amostras de pacientes portadores de Psoríase foram incluídas no estudo devido ao fato de que na rotina do diagnóstico clínico, as lesões apresentadas por esses pacientes podem ser confundidas com as de LT (ÁLVAREZ, *et al.*, 2014; RENDON, A.; SCHÄKEL, K., 2019). Os resultados observados de reatividade entre as amostras de LT e Psoríase, indicaram que ambos os pools de peptídeos (P1 e P2) expressaram altos índices de reatividade cruzada, 66,6% e 82%, respectivamente. Uma possível explicação pode ser baseada no fato de que a Psoríase tem como característica uma intensa resposta inflamatória celular (GASPARI, 2006). Desse modo, os resultados falso-positivos podem ser provenientes de ligações inespecíficas das células imunes presentes nas amostras com os anticorpos da reação.

Índices de reatividade cruzada com os pacientes de PSO também foram observados para as três proteínas (0750, 1140 e PADRE). Em seu trabalho, O'DALY, J. A. *et al* (2009) observaram que antígenos de amastigotas de várias espécies de *Leishmania*, utilizados para construção da vacina polivalente AS100, poderiam causar a remissão

clínica de várias formas da psoríase. O trabalho discute que esses antígenos são reconhecidos como componentes comuns da resposta, mostrando-se capazes de interagir e bloquear o receptor da Conavalina A (Con A), reduzindo os níveis de secreção de citocinas como o TNF- α . Essas ligações cruzadas acabam por inibir algumas respostas inflamatórias comuns, causadoras de lesões psoriáticas, pois o antígeno se liga, mas não é capaz de estimular determinada resposta. Assim, esses fatos podem explicar os índices de reatividade cruzada observados dentro dos testes sorológicos testados.

Diante dos resultados obtidos, cada molécula testada no atual trabalho se destacou em um ponto avaliado para o diagnóstico da LT, como sensibilidade e especificidade. Ressaltam-se os resultados observados para a proteína recombinante 1140, que demonstrou maiores valores de sensibilidade e, ao avaliar a curva ROC, foi a molécula que apresentou a melhor área sob a curva, indicando um melhor desempenho entre as testadas. Esses resultados complementam o trabalho de TAVARES D. H. C. (2017), que como já discutido anteriormente, identificou proteínas constituídas de epítomos específicos de célula B, com potencial para o diagnóstico da LT.

Embora sejam necessários mais estudos que otimizem a metodologia da citometria de fluxo para detecção de anticorpos IgG em amostras de soro de pacientes de LT, o uso de moléculas identificadas *in silico* e específicas da *Leishmania (V.) braziliensis* para os testes sorológicos mostra-se promissor para a obtenção de um diagnóstico rápido e eficaz da LT.

7 CONCLUSÕES

- a) O acoplamento das esferas de poliestireno com as moléculas obtidas *in silico* (proteínas 0750, 1140 e PADRE), foi confirmado através da visualização no citômetro de fluxo, confirmando o êxito nessa abordagem;
- b) Não foi possível distinguir as amostras de pacientes portadores de LT ativa dos controles saudáveis, por meio da CF utilizando as proteínas (0750, 1140 e PADRE), indicando a necessidade de otimizações na metodologia do ensaio;
- c) A proteína recombinante 1140 e o pool de peptídeos P1 (específico) demonstraram ser moléculas promissoras para o diagnóstico da LT por meio do teste de ELISA, visto que foi possível distinguir pacientes portadores de LT ativa dos controles saudáveis;
- d) As proteínas 0750 e PADRE apresentaram maiores níveis de especificidade, indicando a possibilidade de obtenção de antígenos eficientes para o diagnóstico diferencial da LT;
- e) Os testes de ELISA utilizando as proteínas (0750, 1140 e PADRE) e os pools de peptídeos (P1 e P2) como antígenos, demonstraram níveis maiores de especificidade, quando comparadas com o ELISA e a CF utilizando, a fração de antígenos solúveis e as formas fixadas da *L. (V.) braziliensis*, mostrando ser abordagem promissora.

8 PERSPECTIVAS

- a) Otimizar os ensaios de citometria de fluxo utilizando as moléculas preditas *in silico*;
- b) Realizar os ensaios de ELISA com a proteína 1140 e o pool de peptídeos P1em um maior número de amostras;
- c) Obter e avaliar o desempenho diagnóstico da proteína quimérica GPG;
- d) Avaliar o desempenho dessas moléculas como critério de cura após o tratamento quimioterápico, utilizando os métodos de ELISA e citometria de fluxo;

REFERÊNCIAS

_____. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. 2010.

ABASS, E. *et al.* rKLO8, a novel *Leishmania donovani*-derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, 2013.

ABRAHAM, R. S.; AUBERT, G. Flow cytometry, a versatile tool for diagnosis and monitoring of primary immunodeficiencies. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 23, n. 4, p. 254-271, 2016.

AHMAD; EWEIDA; SHEWEITA. B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective diagnostics. **Trials in Vaccinology**, v. 5, p. 71-83, 2016.

ALCARO, Maria Claudia *et al.* Synthetic peptides in the diagnosis of HIV infection. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, n. 4, p. 285-290, 2003.

ALKEMADE, J. A. H. The second moment for the Meyer-König and Zeller operators. **Journal of approximation theory**, v. 40, n. 3, p. 261-273, 1984.

ÁLVAREZ, *et al.* Leishmaniasis or psoriasis? A differential diagnosis. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 66, n. 2, p. 305-311, 2014.

ALVAREZ, P. *et al.* Multiple overlapping epitopes in the repetitive unit of the shed acute-phase antigen from *Trypanosoma cruzi* enhance its immunogenic properties. **Infection and immunity**, v. 69, n. 12, p. 7946-7949, 2001.

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

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

ARONSON N. E.; HERWALDT B.L.; LIBMAN M, *et al.* Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America

(IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis* ;63(12):e202–64.2016.

ARONSON, *et al.* Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical infectious diseases**, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 2016.

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

ARROYO-SANCHEZ, M.C. (2001) in *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes*. (Ferreira A.W. and Ávila, S.L.M., Eds.) pp. 9-48. Guanabara

AZEVEDO, *et al.* The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 75-79, 1996.

BACELLAR O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollog KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun** 70: 6734-6740, 2002.

BACELLAR, O., *et al.* Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 1, p. 75-78, 2009.

BADARO, R. *et al.* rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.
BAETEN, D. LP; K., V. K. How Cytokine networks fuel inflammation: Interleukin-17 and a tale of two autoimmune diseases. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 824-825, 2013.

BARRAL A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int J Dermatol**. jul; 34(7): 474-9, 1995.

BENSOUSSAN, *et al.* Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1435-1439, 2006.

BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 6, p. 652-657, 2007.

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

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

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

BYRNE, R.; SCHNEIDER, G. In silico target prediction for small molecules. In: Systems Chemical Biology. **Humana Press**, New York, NY. p. 273-309, 2019.

CABALLERO, *et al.* Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 8, p. 1045-1049, 2007.

CAI, C. *et al.* In vivo photoacoustic flow cytometry for early malaria diagnosis. **Cytometry Part A**, v. 89, n. 6, p. 531-542, 2016.

CAMPANELLI AP, ROSELINO AM, CAVASSANI KA, *et al.* CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J Infect Dis**; 193: 1313–1322. 2006.

CARLSEN, *et al.* Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 182, n. 2, p. 109-118, 2015.

CARMONA, S. J. *et al.* Diagnostic peptide discovery: prioritization of pathogen diagnostic markers using multiple features. **PloS one**, v. 7, n. 12, 2012.

CARVALHO, E. M. *et al.* Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 53, n. 3, p. 273-277, 1995.

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. **Human Immunology**, New York, v. 70, n. 6, p. 383-390, 2009.

- CATALDO J.I., *et al.* Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **J Clin Lab Anal.**;24:289-94, 2010.
- CELESTE, B. J. *et al.* Leishmania infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 11, p. 1591-1593, 2004.
- CHEN, J. *et al.* Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. **Amino acids**, v. 33, n. 3, p. 423-428, 2007.
- CHENG, J.; KLAIRMONT, M. M.; CHOI, J. K. Peripheral blood flow cytometry for the diagnosis of pediatric acute leukemia: Highly reliable with rare exceptions. **Pediatric blood & cancer**, v. 66, n. 1, p. e27453, 2019.
- CHIARAMONTE, *et al.* Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. **Acta Tropica**, v. 72, n. 3, p. 295-308, 1999.
- CHIARAMONTE, *et al.* *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. human mixed infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 54, n. 3, p. 271-273, 1996.
- CHOU, Kuo-Chen. Impacts of bioinformatics to medicinal chemistry. **Medicinal chemistry**, v. 11, n. 3, p. 218-234, 2015.
- CHRISTOPHERS, E. Psoriasis—epidemiology and clinical spectrum. **Clinical and experimental dermatology**, v. 26, n. 4, p. 314-320, 2001.
- COTA, G. F. *et al.* The cure rate after placebo or no therapy in American cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 11, n. 2, 2016.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502- 508, 2003.
- CUBA- CUBA, *et al.* Identification of human stocks of *Leishmania* spp. isolated from patients with mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 5, p. 708-710, 1984.

CURTIS, M. M.; WAY, S. S.. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 177-185, 2009.

DA SILVA SANTOS; BRODSKYN. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in public health**, v. 2, p. 165, 2014.

DALTRO, *et al.* Cross-reactivity using chimeric *Trypanosoma cruzi* antigens: diagnostic performance in settings where Chagas disease and American cutaneous or visceral leishmaniasis are coendemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 8, 2019.

DAVIES, Matthew N.; FLOWER, Darren R. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. **Drug discovery today**, v. 12, n. 9-10, p. 389-395, 2007.

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

DE CASTRO ZACCHE-TONINI, *et al.* Establishing tools for early diagnosis of congenital toxoplasmosis: Flow cytometric IgG avidity assay as a confirmatory test for neonatal screening. **Journal of immunological methods**, v. 451, p. 37-47, 2017.

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

DE OLIVEIRA, *et al.* Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of immunological methods**, v. 387, n. 1-2, p. 245-253, 2013.

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

DE SOUZA CARMO. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PLoS ONE** 5, e13815, 2010.

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

DE VRIES,; REEDIJK,.; SCHALLIG, DFH. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American journal of clinical dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99-109, 2015.

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

DIAS, D. S. *et al.* Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. **Parasitology international**, v. 67, n. 3, p. 344-350, 2018.

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

DU, L. *et al.* The evolution of guidelines for the validation of flow cytometric methods. The Official journal of the International Society for Laboratory Hematology, 37: 3-10, 2015.

DUARTE, Mariana C. *et al.* Proteins selected in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 22, n. 11, p. 1187-1196, 2015.

DUQUE, *et al.* Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 774-776, 2016.

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

ESPIR, T. T. *et al.* The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines in patients infected with cutaneous leishmaniasis in Amazonas state, Brazil. **Journal of immunology research**, v. 2014, 2014.

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

FABER, William R. *et al.* Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 1, p. 70- 74, 2003.

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

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

FARAHMAND, M.; NAHREVANIAN, H. Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. **Iranian biomedical journal**, v. 20, n. 3, p. 128, 2016.

FERNANDEZ-FLORES . A new scenario in the immunohistochemical diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of cutaneous pathology**, v. 44, n. 12, p. 1051-1052, 2017.

FERREIRA, Flávia Regina et al. Leishmaniose Tegumentar Americana: Uma Doença Polimorfa. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, v. 76, n. 2, p. 177-180, 2018.

FERRUA, et *al.* Antigenemia in patients with mediterranean visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3760-3762, 2009.

FLOWER, D. R.; DOYTCHINOVA, I. A. Immunoinformatics and the prediction of immunogenicity. **Appl. Bioinformatics.**, Auckland, v. 1, n. 4, p. 167-176, 2002.

FONSECA, Aliani Moura et al. Evaluation of three recombinant Leishmania infantum antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta tropica**, v. 137, p. 25-30, 2014.

FREIRE, et *al.* Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007484, 2019.

FREITAS-E-SILVA, R. DE et *al.* Immunogenicity of Potential CD4 + and CD8 + T Cell Epitopes Derived From the Proteome of Leishmania braziliensis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. February, p. 1–14, 2020.

GADELHA, et *al.* Tratamento da leishmanise tegumentar americana com injeções intralesionais de n-metil-glucamina. **An bras dermatol**, v. 65, n. 4, p. 201-3, 1990.

GARCIA, *et al.* Anti-fixed *Leishmania chagasi* promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC-AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in American visceral leishmaniasis. **Journal of immunological methods**, v. 350, n. 1-2, p. 36-45, 2009.

GARDY, Jennifer L. *et al.* Enabling a systems biology approach to immunology: focus on innate immunity. **Trends in immunology**, v. 30, n. 6, p. 249-262, 2009.

GASPARI. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 3, p. S67-S80, 2006.

GIDWANI, K. *et al.* Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 346-348, 2011.

GOMARA, M. J.; HARO, I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 5, p. 531-546, 2007.

GOMARA, M. J.; HARO, I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 5, p. 531-546, 2007.

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

GOMEZ-OCHOA, P. *et al.* Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, n. 5, p. 967-968, 2003.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C. *et al.* The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1437, 2017.

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

GONZALEZ, A. C. *et al.* Analysis of NLS and rRNA binding motifs in the L25 ribosomal protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis*: investigation of its diagnostic capabilities. **Parasitology**, v. 125, n. 1, p. 51-57, 2002.

GONZÁLEZ-SAPIENZA, G.; LORENZO, C.; NIETO, A.. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 3979-3983, 2000.

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

GUPTA, K. *et al.* Performance of Chlamydia trachomatis OmcB ELISA in the Serodiagnosis of Chlamydia trachomatis Infection in Women. **Journal of Clinical Microbiology**, 2018.

GUTIERREZ, *et al.* Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 45, n. 3, p. 281-289, 1991.

HANS; YOUNG.; FAIRLIE. Current status of short synthetic peptides as vaccines. **Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 627-646, 2006.

HERNÁNDEZ, C.; RAMÍREZ, J. D. Molecular diagnosis of vector-borne parasitic diseases. **Air & Water Borne Diseases**, v. 2, p. 1-10, 2013.

HODOS, R. A. *et al.* In silico methods for drug repurposing and pharmacology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 186-210, 2016.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; STRYCH, U. New Vaccines for the World ' s Poorest People. **Annual Reviews of Medicine**, v. 67, p. 405–417, 2016.

IKEOGU, M. *et al.* Leishmania immunity: advancing immunotherapy and vaccine development. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1201, 2020.

JIMENEZ-MARCO, T. *et al.* Transfusion-transmitted leishmaniasis: a practical review. **Transfusion**, v. 56, p. S45-S51, 2016.

JOHNSON-HUANG, *et al.* A single intradermal injection of IFN- γ induces an inflammatory state in both non-lesional psoriatic and healthy skin. **Journal of investigative dermatology**, v. 132, n. 4, p. 1177-1187, 2012.

KAIKO, G. E. *et al.* Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?. **Immunology**, v. 123, n. 3, p. 326-338, 2008.

KAR. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical reviews in microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

KER, H. *et al.* Multiplex flow cytometry serology to diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 19, p. 8179-8190, 2019

.

KHADER, S. A.; GOPAL, R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 423-427, 2010.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1443-1474, 2012.

KOOGAN, A. N., B., COLMENARES, C.; NOYA, O. Comunidad antigénica y reactividad cruzada: su repercusión en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades parasitarias. Especial referencia a esquistosomiasis. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**. Rio de Janeiro. 20, 163- 171, 2001.

KORBER, Bette; LABUTE, Montiago; YUSIM, Karina. Immunoinformatics comes of age. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 6, p. e71, 2006.

KORBER,; LABUTE,; YUSIM. Immunoinformatics comes of age. **PLoS Comput Biol**, v. 2, n. 6, p. e71, 2006.

KORBER; LABUTE; YUSIM, 2006; HODOS, R. A. *et al.*, 2016; BYRNE, R.; SCHNEIDER, G., 2019.

KORN, T. *et al.* IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KURRIKOFF; APHKHAZAVA; LANGEL. The future of peptides in cancer treatment. **Current opinion in pharmacology**, v. 47, p. 27-32, 2019.

LAGE, *et al.* A new Leishmania-specific hypothetical protein and its nondescribed specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral

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

LEMOS, *et al.* Detection of anti-Leishmania (Leishmania) chagasi immunoglobulin G by flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 5, p. 569-576, 2007.

LESK, A. M. **Introdução à Bioinformática**. 2. ed., Porto Alegre: Artmed, 2008.
LÉVÊQUE, *et al.* Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 3, p. e0008139, 2020.

LIMA, M. P. *et al.* Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. **Parasitology research**, v. 116, n. 4, p. 1197-1206, 2017.

LIMA, Mariana Pedrosa *et al.* Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. **Parasitology research**, v. 116, n. 4, p. 1197-1206, 2017.

LINK, J. S. *et al.* Synthetic peptides as potential antigens for cutaneous leishmaniosis diagnosis. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.

LINK, Juliana Seger *et al.* Synthetic peptides as potential antigens for cutaneous leishmaniosis diagnosis. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.

LIU, Y. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 259-262, 2001.

LU, Y. *et al.* Chimeric peptide constructs comprising linear B-cell epitopes: application to the serodiagnosis of infectious diseases. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.

LUZ KG. *et al.* Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. **Am J Trop Med Hyg**; 51 : 168-71, 1997.

MABEY, David *et al.* Tropical infectious diseases: diagnostics for the developing world. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 231, 2004.

MAKSIMOV, *et al.* Peptide microarray analysis of in silico-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 6, p. 865-874, 2012.

MANSUETO, Pasquale *et al.* Leishmaniasis intravelers: a literature review. **Travel medicine and infectious disease**, v. 12, n. 6, p. 563-581, 2014.

MARIA RITA. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Control Program in large cities. **Cadernos de saude publica**, v. 32, n. 6, 2016.

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

MARZOCHI MC. Leishmanioses no Brasil: As Leishmanioses Tegumentares. **J Bras Med**. 63(5-6): 82-104, 1992.

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

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, 2019.

MENEZES-SOUZA, Daniel *et al.* Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin L-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 1, p. e3426, 2015.

MENEZES-SOUZA, Daniel *et al.* Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from *Leishmania braziliensis*: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1323-1336, 2015.

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

MENGISTU, *et al.* Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 154-157, 1992.

MERRYFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. **J. Am. Chem. sot**, v. 85, p. 2149, 1963.

MILLS, K. H. G. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. **European journal of immunology**, v. 38, n. 10, p. 2636-2649, 2008.

MIN; LEE; YOON. Deep learning in bioinformatics. **Briefings in bioinformatics**, v. 18, n. 5, p. 851-869, 2017.

MISHRA, Arti R. et al. Synthetic Peptides are Better Than Native Antigens for Development of ELISA Assay for Diagnosis of Tuberculosis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 23, n. 2, p. 247-257, 2017.

MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 312-325, 2017.

MOSLEH, *et al.* Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. **Acta tropica**, v. 59, n. 2, p. 163-172, 1995.

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

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

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

NOVAIS, F. O. *et al.* Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **J. Infect. Dis.** **209**, 1288–1296 , 2014.

NOVOA, R. *et al.* IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. **Parasite immunology**, v. 33, n. 2, p. 132-136, 2011.

NOYA, O. *et al.* Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, n. 4, p. 299-308, 2003.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 34, n. 12, p. 551-561, 2012.

NYLÉN, S.; KUMAR, R. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 251, 2012.

O'DALY, J. A. *et al.* Antigens from *Leishmania* amastigotes induced clinical remission of psoriasis. **Archives of dermatological research**, v. 301, n. 1, p. 1-13, 2009.

OLIVEIRA LF, *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Trop** 118: 87–96. 2011.

OLIVEIRA, B. C. *et al.* American tegumentary leishmaniasis and flow cytometry: a review. **J Med Microb Diagn**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2016.

OLIVEIRA, G. *et al.* Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025-1034, 2011.

O'NEIL, C. E.; LABRADA, M.; SARAVIA, N. G. *Leishmania* (Viannia) panamensis-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 49, n. 2, p. 181-188, 1993.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Americas. Washington, D.C.: OPS; 2019. PAI, N. P. *et al.* Modern diagnostic technologies for HIV. **The Lancet HIV**, v. 7, n. 8, p. e574-e581, 2020.

PALATNIK-DE-SOUSA.; DAY. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 197, 2011.

PANAMÉRICAIN DE LA SANTÉ, Organisation. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas [Internet]. **Washington (DC). Washington (DC): OPS**, 2019.

PANDIARAJA, Pandurangan *et al.* Evaluation of synthetic peptides of WbSXP-1 for the diagnosis of human lymphatic filariasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 68, n. 4, p. 410-415, 2010.

PANIZ-MONDOLFI, *et al.* Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 52, n. 4, p. 446-455, 2013.

PARK, *et al.* CD4⁺ TH1 cells generated by Ii-PADRE DNA at prime phase are important to induce effectors and memory CD8⁺ T cells. **Journal of Immunotherapy**, v. 33, n. 5, p. 510-522, 2010.

PARK, J.Y., *et al.* CD4⁺ TH1 Cells Generated by Ii-PADRE DNA at Prime Phase Are Important to Induce Effectors and Memory CD8⁺ T Cells. **J Immunother**, 33(5), 2010.

PARSA, *et al.* Early diagnosis of disease using microbead array technology: a review. **Analytica chimica acta**, v. 1032, p. 1-17, 2018.

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

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

PEREIRA, V. R. *et al.* Evaluation of anti-living and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 74, n. 3, p. 292-8, Nov 2012.

PETERS, Bjoern *et al.* The design and implementation of the immune epitope database and analysis resource. **Immunogenetics**, v. 57, n. 5, p. 326-336, 2005.

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

PINGPING S. *et al.* Bioinformatics Resources and Tools for Conformational B-Cell Epitope Prediction. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**. v.2013. p.11, 2013.

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

POLESE, B. *et al.* Innate lymphocytes in psoriasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

PORTER, Ruth; WHELAN, Julie (Ed.). **Synthetic peptides as antigens**. John Wiley & Sons, 2008.

PORWIT, *et al.* Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes—proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. **Leukemia**, v. 28, n. 9, p. 1793-1798, 2014.

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

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

RENDON, A.; SCHÄKEL, K. Psoriasis pathogenesis and treatment. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, p. 1475, 2019.

ROBINSON, J. P.; ROEDERER, M. Flow cytometry strikes gold. **Science**, v. 350, n. 6262, p. 739-740, 2015.

ROCHA, F. J., Schleicher, U., Mattner, J., Alber, G. & Bogdan, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.** **75**, 3823–3832, 2007.

ROCHA, R. D. R., *et al.* Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade FERREIRA eira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 551-562, 2002.

RODRIGUES, E. H. G. *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 3572-3576, Oct., 2002.

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

RODRIGUEZ. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. **Parasite immunology**, v. 18, n. 7, p. 341-345, 1996.

ROGIER, *et al.* Bead-based immunoassay allows sub-picogram detection of histidine-rich protein 2 from *Plasmodium falciparum* and estimates reliability of malaria rapid diagnostic tests. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0172139, 2017.

ROMERO, *et al.* Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L.(V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 456-465, 2001.

ROMERO, *et al.* Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta tropica**, v. 93, n. 1, p. 49-56, 2005.

SAADI M, KARKHAH A, NOURI HR. Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. **Infect Genet Evol.** Jul;51:227-234, 2017.

SAADI; KARKHAH; NOURI. Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 51, p. 227-234, 2017.

SAKAGUCHI S, *et al.* Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, 133, 775- 787. 2008.

SAKKAS H, GARTZONIKA C, LEVIDIOTOU S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis* 53:8–16. 2016.

SALARPOUR, *et al.* In silico prediction of linear B-cell epitopes for S1 protein of two Iranian 793/B isolates and their changes after 90 serial passaging. In: **Veterinary Research Forum**. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University. p. 365-370, 2020.

SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas–Drogas antimicóticas e antivirais. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 799-807, 1987.

SANTARÉM, N. *et al.* Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1866-1874, 2010.

SANTOS, S. C.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 1-6, 2014.

SATO, C. M. *et al.* Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different *Leishmania* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 2, p. 495-503, 2017.

SCHÖN. Adaptive and innate immunity in psoriasis and other inflammatory disorders.

Frontiers in immunology, v. 10, p. 1764, 2019.

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

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

SILVA, R. E. *et al.* Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 512-516, 2016.

SILVA, R. F. Identificação e avaliação imunológica de potenciais epítomos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no proteoma de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2016.

SILVA-BARRIOS, S; CHARPENTIER, T.; STÄGER, S. The deadly dance of B cells with Trypanosomatids. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 2, p. 155-171, 2018.

SILVESTRE, R., *et al.* Evaluation of *Leishmania* species reactivity in human serologic diagnosis of leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 2, p. 202-208, 2009.

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

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

SOUSA, S. *et al.* Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 8, 2013.

SOUSA, Susana *et al.* Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2371, 2013.

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

SOUZA, M. A., *et al.* American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease and after clinical cure, with or without chemotherapy. **Scandinavian journal of immunology**, v. 76, n. 2, p. 175-180, 2012.

SUN, P. *et al.* Advances in in-silico B-cell epitope prediction. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 19, n. 2, p. 105-115, 2019.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

SUNDAR, Shyam; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAM, JAMES P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 15, p. 5409-5413, 1988.

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

TAVARES C. A., FERNANDES A.P., MELO M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Rev Mol Diagn** 3:657–667, 2003.

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

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

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

TIUMAN, Tatiana S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Disease**, v. 15, n. 8, p. e525-e532, 2011.

TOMAR, Namrata; DE, Rajat K. Immunoinformatics: an integrated scenario. **Immunology**, v. 131, n. 2, p. 153-168, 2010.

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

TUON F. F. *et al.* Treatment of New World cutaneous leishmaniasis—a systematic review with a meta-analysis. **Int J Dermatol.** 47(2):109–124, Feb, 2008.

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

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

VEGA-LÓPEZ, Francisco. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

VEXENAT, A. D. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

VON STEBUT, E, *et al.* Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **J. Exp. Med.** 188, 1547–1552, 1998.

WHO. Recognizing neglected tropical diseases through changes on the skin: a training guide for front-line health workers. 2018.

WHO/PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. N° 7. **Department of Neglected Infectious Diseases**, March. 2019.

WIELAND, Theodor; BODANSZKY, Miklos. **The world of peptides: a brief history of peptide chemistry**. Springer Science & Business Media, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) *et al.* Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. **World Health Organization**, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) *et al.* **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases.** World Health Organization, 2010.

WU, CHAO-LIANG *et al.* Hepatitis C virus core protein fused to hepatitis B virus core antigen for serological diagnosis of both hepatitis C and hepatitis B infections by ELISA. **Journal of medical virology**, v. 57, n. 2, p. 104-110, 1999.

YANG, *et al.* Micro flow cytometry utilizing a magnetic bead-based immunoassay for rapid virus detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 4, p. 855-862, 2008.

YASSER; DOBBS; HONAVAR. In silico prediction of linear B-cell epitopes on proteins. In: **Prediction of Protein Secondary Structure**. Humana Press, New York, NY. p. 255-264, 2017.

ZANETTE, M. F. *et al.* Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014.

ZANETTE, Maurício Franco *et al.* Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014.

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

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

ZER R. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **Int J Parasitol**, 31, 810-814, 2001.

ZÚÑIGA, L. A. *et al.* Th17 cell development: from the cradle to the grave. **Immunological reviews**, v. 252, n. 1, p. 78-88, 2013.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPOS PACIENTES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: VALIDAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA UTILIZANDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS

Você está sendo convidado (a) para participar voluntariamente desta pesquisa, que tem como objetivo estudar os aspectos de defesa do indivíduo doente relacionados ao diagnóstico de pacientes com Leishmaniose cutânea. A Leishmaniose cutânea é uma doença causada pelo micróbio *Leishmania braziliensis*, e é considerada um sério problema de saúde pública no Brasil. Um dos principais desafios dessa doença é o seu diagnóstico. Não existe um método único para diagnóstico, e os métodos que são mais utilizados atualmente, podem apresentar algumas dificuldades em identificar o paciente com a doença. Assim, é necessário estudos de métodos de diagnóstico alternativos e os aspectos relacionados a defesa ao parasita (sistema imunológico) do paciente precisam ser investigados, para que seja desenvolvida medidas para o controle da doença.

Procedimentos da Pesquisa

Se concordar, você participará da pesquisa através das seguintes etapas:

- 1- Coleta de sangue - 20ml (4 colheres de chá) de sangue coletado na veia para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio

Caso você esteja em tratamento ou com indicação de tratamento pela equipe médica que lhe acompanha, você será convidado para realizar um acompanhamento durante o período de tratamento e após o tratamento com novas coletas de sangue.

Possíveis riscos e desconfortos:

No momento da entrevista, você poderá se sentir constrangido (a) com alguma pergunta que seja realizada. No momento da coleta de sangue você pode sentir um desconforto no local, na hora da picada, recomenda-se não friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais de saúde treinados, em que tomarão as medidas necessárias para minimizar os riscos e desconfortos.

Benefícios ao participante:

Você terá acesso aos resultados dos exames realizados e as medidas preventivas e de tratamento serão realizadas caso necessárias para minimizar o tempo de duração da doença e a possibilidade de novas infecções. Além disso, essa

pesquisa trará grande benefício, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. Portanto, no futuro espera-se que essa pesquisa possa contribuir com estratégias para que o diagnóstico seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida.

Direitos do(a) participante:

1. De ter resposta a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. De retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e isso não vai implicar em prejuízo de qualquer natureza para sua pessoa;
3. De ter segurança que o(a) senhor (a) não será identificado de nenhuma forma e garantindo a sua privacidade.
4. De não assumir qualquer despesa ao participar da pesquisa e quando ocorrer, ter direito à ressarcimento.
5. De ter garantida assistência integral imediata e gratuita em caso de qualquer dano decorrente da pesquisa.
6. De ter acesso aos resultados dos exames e às medidas preventivas e de tratamento, necessárias para minimizar o tempo de duração da doença e a possibilidade de novas infecções.

Finalmente, solicitamos sua autorização para que as amostras de sangue coletadas possam ser estocadas no banco de amostras, sob a guarda dos pesquisadores do presente estudo, localizado no departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães/Pernambuco, por um período máximo de 10 anos. Caso seja realizada pesquisas futuras, um novo consentimento será pedido ao senhor(a) e a qualquer momento o(a) senhor(a) poderá solicitar a remoção de seus dados e amostras da pesquisa. Essas informações serão utilizadas para fins de publicações científicas, respeitando as mesmas garantias acima. Se o(a) senhor(a) concordar em participar desse estudo, pedimos que assine este documento, em duas vias, sendo uma delas de sua propriedade, afirmando que entendeu as explicações e que está de acordo

Recife, _____ / _____ / 201__.

Eu, _____, declaro

que compreendi este termo e aceito participar do estudo.

Assinatura da

participante: _____

Impressão
digital

Assinatura Testemunha: _____

Assinatura do entrevistador _____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Valéria Pereira Hernandes
Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães
Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE
CEP: 50670-420 Recife-PE
Fone: 0XX81 2101-2631

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo,
o (a)
senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de
pesquisas,
localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária,
Recife/PE, CEP:50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail:
comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP
é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas
envolvendo seres humanos.

**Esse projeto antes de seu inicio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do
Instituto Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnen**

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPOS MENOR DE 18 ANOS

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – MENORES DE 18 ANOS

PESQUISA: VALIDAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA UTILIZANDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS

Você está sendo convidado (a) para participar voluntariamente desta pesquisa, que tem como objetivo estudar os aspectos de defesa do indivíduo doente relacionados ao diagnóstico de pacientes com Leishmaniose cutânea. A Leishmaniose cutânea é uma doença causada pelo micróbio *Leishmania braziliensis*, e é considerada um sério problema de saúde pública no Brasil. Um dos principais desafios dessa doença é o seu diagnóstico. Não existe um método único para diagnóstico, e os métodos que são mais utilizados atualmente, podem apresentar algumas dificuldades em identificar o paciente com a doença. Assim, é necessário estudos de métodos de diagnóstico alternativos e os aspectos relacionados a defesa ao parasita (sistema imunológico) do paciente precisam ser investigados, para que seja desenvolvida medidas para o controle da doença.

Procedimentos da Pesquisa

Se concordar, você está sendo convidado a participar deste estudo devido ao mesmo se encontrar no grupo de pacientes menores de 18 anos, para isso, haverá as seguintes etapas:

- 2- Coleta de sangue - 20ml (4 colheres de chá) de sangue coletado na veia para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio

Caso você esteja em tratamento ou com indicação de tratamento pela equipe médica que o acompanha, você será convidado para realizar um acompanhamento durante o período de tratamento e após o tratamento com novas coletas de sangue. Além disso, seu prontuário com as informações de acompanhamento clínico será consultado para complementar as informações da pesquisa.

Possíveis riscos e desconfortos:

No momento da entrevista, você poderá se sentir constrangido (a) com alguma pergunta que seja realizada. No momento da coleta, poderá sentir um desconforto no local, na hora da picada, recomenda-se não friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais de saúde treinados, em que tomarão as medidas necessárias para minimizar os riscos e desconfortos.

Benefícios ao participante:

Você terá acesso aos resultados dos exames realizados e as medidas preventivas e de tratamento serão realizadas caso necessárias para minimizar o tempo de duração da doença e a possibilidade de novas infecções. Além disso, essa pesquisa trará grande benefício, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. Portanto, no futuro espera-se que essa pesquisa possa contribuir com estratégias para que o diagnóstico seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida.

Direitos do(a) participante:

7. De ter resposta a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa;
8. De retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e isso não vai implicar em prejuízo de qualquer natureza para sua pessoa;
9. De ter segurança que o(a) senhor (a) não será identificado de nenhuma forma e garantindo a sua privacidade.
10. De não assumir qualquer despesa ao participar da pesquisa e quando ocorrer, ter direito à ressarcimento.
11. De ter garantida assistência integral imediata e gratuita em caso de qualquer dano decorrente da pesquisa.
12. De ter acesso aos resultados dos exames e às medidas preventivas e de tratamento, necessárias para minimizar o tempo de duração da doença e a possibilidade de novas infecções.

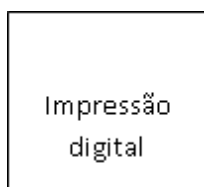
Finalmente, solicitamos sua autorização para que as amostras de sangue coletadas possam ser estocadas no banco de amostras, sob a guarda dos pesquisadores do presente estudo, localizado no departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães/Pernambuco, por um período máximo de 10 anos. Caso seja realizada pesquisas futuras, um novo consentimento será pedido ao senhor(a) e a qualquer momento o(a) senhor(a) poderá solicitar a remoção de seus dados e amostras da pesquisa. Essas informações serão utilizadas para fins de publicações científicas, respeitando as mesmas garantias acima. Se você concordar em participar desse estudo, pedimos que assine este documento, em duas vias, sendo uma delas de sua propriedade, afirmando que entendeu as explicações e que está de acordo.

Recife, _____ / _____ / 201____.

Eu, _____, declaro

que compreendi este termo e aceito participar do estudo.

Assinatura da menor: _____



Assinatura Testemunha: _____

Assinatura do entrevistador _____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Valéria Pereira Hernandez
Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães
Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE
CEP: 50670-420 Recife-PE
Fone: 0XX81 2101-2631

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo,
o _____ (a)

senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas,

localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP:50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Esse projeto antes de seu inicio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPOS CONTROLES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: VALIDAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA UTILIZANDO ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS

Você está sendo convidado (a) para participar voluntariamente desta pesquisa, que tem como objetivo estudar os aspectos de defesa do indivíduo doente relacionados ao diagnóstico de pacientes com Leishmaniose cutânea. A Leishmaniose cutânea é uma doença causada pelo micróbio *Leishmania braziliensis*, e é considerada um sério problema de saúde pública no Brasil. Um dos principais desafios dessa doença é o seu diagnóstico. Não existe um método único para diagnóstico, e os métodos que são mais utilizados atualmente, podem apresentar algumas dificuldades em identificar o paciente com a doença. Assim, é necessário estudos de métodos de diagnóstico alternativos e os aspectos relacionados a defesa ao parasita (sistema imunológico) do paciente precisam ser investigados, para que seja desenvolvida medidas para o controle da doença.

Procedimentos da Pesquisa

Se concordar, você participará da pesquisa através das seguintes etapas:

- 3- Coleta de sangue - 20ml (4 colheres de chá) de sangue coletado na veia para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio

Possíveis riscos e desconfortos:

No momento da entrevista, você poderá se sentir constrangido (a) com alguma pergunta que seja realizada. No momento da coleta de sangue você pode sentir um desconforto no local, na hora da picada, recomenda-se não friccionar (movimento com força) o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais de saúde treinados, em que tomarão as medidas necessárias para minimizar os riscos e desconfortos.

Benefícios ao participante:

Você terá acesso aos resultados dos exames realizados e as medidas preventivas e de tratamento serão realizadas caso necessárias para minimizar o tempo de duração da doença e a possibilidade de novas infecções. Além disso, essa pesquisa trará grande benefício, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. Portanto, no futuro espera-se que essa pesquisa possa contribuir com estratégias para que o diagnóstico seja realizado de forma mais segura, com redução do tempo de internação e com recuperação mais rápida.

Direitos do(a) participante:

13. De ter resposta a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa;
14. De retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e isso não vai implicar em prejuízo de qualquer natureza para sua pessoa;
15. De ter segurança que o(a) senhor (a) não será identificado de nenhuma forma e garantindo a sua privacidade.
16. De não assumir qualquer despesa ao participar da pesquisa e quando ocorrer, ter direito à ressarcimento.
17. De ter garantida assistência integral imediata e gratuita em caso de qualquer dano decorrente da pesquisa.
18. De ter acesso aos resultados dos exames e às medidas preventivas e de tratamento, necessárias para minimizar o tempo de duração da doença e a possibilidade de novas infecções.

Finalmente, solicitamos sua autorização para que as amostras de sangue coletadas possam ser estocadas no banco de amostras, sob a guarda dos pesquisadores do presente estudo, localizado no departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães/Pernambuco, por um período máximo de 10 anos. Caso seja realizada pesquisas futuras, um novo consentimento será pedido ao senhor(a) e a qualquer momento o(a) senhor(a) poderá solicitar a remoção de seus dados e amostras da pesquisa. Essas informações serão utilizadas para fins de publicações científicas, respeitando as mesmas garantias acima. Se o(a) senhor(a) concordar em participar desse estudo, pedimos que assine este documento, em duas vias, sendo uma delas de sua propriedade, afirmando que entendeu as explicações e que está de acordo

Recife, _____ / _____ / 201____.

Eu, _____, declaro

que compreendi este termo e aceito participar do estudo.

Assinatura da participante: _____



Assinatura Testemunha: _____

Assinatura do entrevistador _____

Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com:

Dra. Valéria Pereira Hernandes
Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães
Av. Moraes Rego, s/n , no Campus da UFPE
CEP: 50670-420 Recife-PE
Fone: 0XX81 2101-2631

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo,
o (a)

senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas,

localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP:50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 8 – 12 h e das 13 – 17h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Esse projeto antes de seu inicio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães, podendo ser confirmado no site www.saude.gov.br/sisnep

APÊNDICE D - ARTIGO PUBLICADO 1

Mendes et al. *BMC Infectious Diseases* (2019) 19:1015
<https://doi.org/10.1186/s12879-019-4642-7>

BMC Infectious Diseases

RESEARCH ARTICLE

Open Access



American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L. (V.) braziliensis* fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification

Andresa Pereira Oliveira Mendes^{1,2*†}, Beatriz Coutinho Oliveira^{1,2†}, Allana Maria S. Pereira¹, Maria Carolina Accioly Brelaz Castro³, Marina Assis Souza¹, Maria Edileuza Felinto Brito¹, Fernanda Fortes Araújo⁴, Andrea Teixeira-Carvalho⁴, Olindo Assis Martins-Filho⁴ and Valeria Rêgo Alves Pereira¹

Abstract

Background: The present study aimed to demonstrate the applicability of a flow cytometry-based serology approach to identify spontaneous cure by the detection of immunoglobulin G, and also, the diagnosis and cure criterion by the IgG1 isotype in American Tegumentary Leishmaniasis – ATL caused by *L. (V.) braziliensis*. Also, a comparison between flow cytometry with the serological conventional technique was performed.

Methods: Forty five individuals were included in study. They were assessed in two moments: First, 8 subjects spontaneously cured of ATL, 8 healthy individuals and 15 patients who had a positive diagnosis for ATL were selected before treatment to identify spontaneous cure by immunoglobulin G detection. Secondly, 14 patients who were positive for ATL were selected and had their blood collected before and 1, 2 and 5 years after treatment, respectively, for the diagnostic tests (ELISA and flow cytometry) and cure criterion evaluation using the IgG1 isotype.

(Continued on next page)

* Correspondence: andresadeolinda@gmail.com

[†]Andresa Pereira Oliveira Mendes and Beatriz Coutinho Oliveira contributed equally to this work.

¹Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego/s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco CEP: 50670-420, Brazil

²Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, Pernambuco, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Results: The analysis of the mean percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) along with the titration curves of IgG anti-fixed promastigotes of *L. (V.) braziliensis*, confirmed the applicability of this method for monitoring spontaneous cure in ATL with outstanding co-positivity (100%) and co-negativity (100%) performance indexes. Regarding the results of the comparison between flow cytometry and ELISA it was seen that there was a better accuracy of the first one in relation to the other. When IgG1 applicability was evaluated, it was observed that before treatment, 36.8% of the patients were negative; in patients 1 year post-treatment, 82.3%; 2 years post-treatment, 27.2% and in patients 5 years post-treatment, 87.5%. The overall analysis of the results suggests that flow cytometry can be applied to ATL detection, and that the use of IgG1 isotype has possibilities to contribute as a more specific diagnostic method.

Conclusions: Therefore, this area has great perspectives use for the diagnosis and cure criterion, and also it can be scaled up with the possibility to characterize the different clinical stages of the disease. Together, these findings demonstrate the applicability of a flow cytometry-based serology approach and opens up new avenues of research with this technique, such as the understanding the humoral response in ATL patients.

Keywords: ATL, *L. (V.) braziliensis*, Flow cytometry, ELISA, Cure criterion and spontaneous cure

Background

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an infectious, chronic, non-contagious disease which affects millions of people worldwide and is still a serious public health issue. The 3 most common species in Brazil are *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, respectively. ATL presents a variety of clinical forms ranging from limited cutaneous lesions until mucocutaneous disfiguration, and its evolution depends on the immunological status of the patient and the involved *Leishmania* species, where *Leishmania (Viannia) braziliensis* stands out as the main cause of ATL in Pernambuco [1–4].

A timely and adequate treatment is necessary to prevent disease aggravation to destructive and severe forms. The current treatment options present high toxicity and important adverse effects, none of which are sufficiently effective [5–7]. Besides, there is no cure criterion available based on the spontaneous cure assessment, what suggests that the patients who were spontaneously cured have developed an immune response capable of controlling their *Leishmania* infection [8, 9]. Due to that, the laboratorial diagnosis of ATL can be considered a challenge nowadays. Therefore, the search for new diagnostic tools is highly necessary. Although a variety of tests including serological, parasitological and molecular methods are available, the diagnosis of ATL is still unsatisfactory [10]. Serological methods based on antibody detection are the most widely used tests worldwide [11–13], however, a variable efficacy can be observed, since they might present low or no levels of *Leishmania*-specific antibodies, those of which can still remain positive for years. The cross-reactivity with other diseases, including Chagas disease and visceral leishmaniasis are also one of their biggest limitations [6, 14]. This stimulates the search for novel methodologies that can reach a higher efficacy.

Up to the moment, ATL's diagnosis is performed by an association of epidemiological, clinical and laboratorial results. Since there is no diagnostic test considered as the gold standard for ATL, the association of these elements is necessary to achieve the final diagnosis [6, 15]. The parasitological test is made through smear (parasite direct search), culture in specific medium or histopathological tests. The smear has a sensitivity of 50 to 70% and it depends on the number of parasites on the slide. The test's positivity is inversely proportional to the evolution time of the cutaneous lesion, being lower after 1 year. Although it is a simple, quick and inexpensive technique, it is not able to detect parasites in every patient. The sensitivity of isolation in culture is generally low, around 20 to 40%, and in many cases, it is related to the scarcity parasites in the lesions, especially when it comes to *L. (V.) braziliensis* [16–19].

Immunological methods such as the Montenegro's skin test (IDRM) rely on the evaluation of the patient's cellular immune response, whereas indirect immunofluorescence (IFI), immunoenzymatic assay (ELISA) and western blot are based on the humoral response, the latter being more commonly used. In ATL, the immunological procedures are the only applied methods which can detect the disease in its initial stages before the beginning of the treatment [2, 20]. The IDRM has been used as an important resource in the immunological diagnosis of ATL given its great sensitivity and specificity. Although it shows a positive result in most cases of ATL (90%), the result is negative in recent lesions, in the diffuse cutaneous form and in immunosuppressed patients. In endemic areas, the test is usually positive due to subclinical infections. In addition, the test does not differentiate infection from disease or an active disease from a previous one [16, 19, 21]. IFI, ELISA and Western blot present important disadvantages especially

regarding sensitivity, specificity and poor reproducibility. Apart from that, they may cross-react with other trypanosomatids. It is also known that low levels of antibodies are detected by these techniques, and that there is no correlation between circulating antibodies with the presence of an active infection [22, 23]. Because of that, diagnostic methods are urgently needed and researchers around the world have been developing new technologies to ensure the continuous improvement of the available tools [23–25].

The first flow cytometer was a single-parameter instrument which could only detect the size of the cells. Currently, highly sophisticated instruments with the ability of detecting 14 parameters simultaneously have become a reality [23]. This tool has made a revolution in the diagnosis field since it could enable a precise evaluation of multiple biological processes. Although one might raise the limitations associated with its cost, it must be recognized that flow cytometers are already well-established in several reference laboratories, including hospitals and clinics that diagnose patients with HIV [24], and also that its sensitivity is usually higher when compared to other serological tests. Therefore, flow cytometry arises as an extremely versatile technology, associating functionality and precision. It is used in several laboratorial investigations including molecular biology, pathology and immunology, with a vast application in healthcare, especially in transplants, hematology, immune system evaluation, tumor immunology and chemotherapy [23, 25–28]. Several efforts have been made to develop reliable flow cytometry serological approaches for both ATL's diagnosis and cure monitoring, the main one by using distinct antigen preparations to detect anti-*Leishmania* antibodies [29, 30]. Together, these approaches have demonstrated that flow cytometry-based methods can be applied to the diagnosis and post-therapeutic cure assessment in ATL.

In order to improve and innovate flow cytometry assays, this work intended to use anti-fixed *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigote IgG antibodies to demonstrate its applicability in identifying ATL spontaneous cure by differential reactivity when compared to patients with active infection, and also, the use of the IgG1 isotype for the diagnosis and cure criterion, comparing it with the conventional serological methods for ATL.

Methods

Study population

Forty five individuals participated in this study and they were only included when they had their positivity confirmed in at least two tests, including: Montenegro skin test, indirect immunofluorescence and PCR (Fig. 1). Twenty nine patients with positive diagnosis (ATL) were selected before treatment. The experimental design was

carried out in two stages: In the first moment, 15 patients with positive diagnosis for ATL were selected before treatment. Subjects spontaneously cured ATL (CUR = 08) showed complete healing of their lesions without any therapeutic intervention. Serum samples from 8 healthy individuals with no documented infection or exposure to *Leishmania* parasites were included as non-infected controls (NI). In the second moment, 14 patients with positive diagnosis for ATL were selected. They had active lesions and no concomitant cutaneous diseases. Of these, 13, 10 and 10 individuals performed a new blood collection 1, 2 and 5 years, respectively, after treatment and healing of the lesions. All patients with positive ATL came from endemic areas in Pernambuco State. All samples were evaluated as for clinical, epidemiological and laboratorial criteria and all individuals agreed and signed the "Term of Free and Informed Consent". CPqAM/Fiocruz (Protocol no. 001300950000–7). The Research Ethics Committee has approved the experimental protocols.

Parasite preparation

L. (V.) braziliensis promastigotes (MHOM/BR/75/ M2903) were cultivated in Schneider's medium until they reached exponential phase. The parasites were centrifuged at low-speed (100×g), 25 °C for 10 min and were recovered from the supernatant after 10 min of rest at room temperature. The supernatant was transferred to another tube and washed 3 times in saline buffer pH 7.2, containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (phosphate buffered saline (PBS)-10% FBS) at 4 °C, 871×g for 10 min. The pellet of parasites was thoroughly homogenized, re-suspended and fixed in an equal volume of 1% paraformaldehyde, being incubated overnight. The parasites were then washed with PBS-10% FBS, re-suspended and counted using Neubauer chamber, so the concentration was adjusted for the assays.

Flow Cytometry acquisition and analysis

Flow cytometry acquisition and analysis for IgG detection of anti-fixed *L. (V.) braziliensis* promastigotes were performed according to Oliveira et al. (2013). Briefly, the parasite suspension (2.5×10^5 /well) was incubated in 96-well U-bottom plates at 37 °C for 30 min in the presence of serial dilutions of inactivated serum samples (from 1: 64 to 1:8192). After the incubation, the parasites were washed twice with 150 µl of PBS-10% FBS (1000×g for 10 min at 4 °C) and re-incubated at 37 °C for 30 min in the dark with anti-human IgG antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate – FITC (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) previously diluted 1:4000 in PBS – 10% FBS. The FITC-labeled parasites were washed twice and fixed with FACS fix solution for 30 min and stored at 4 °C up to 24 h before flow cytometry analyses.

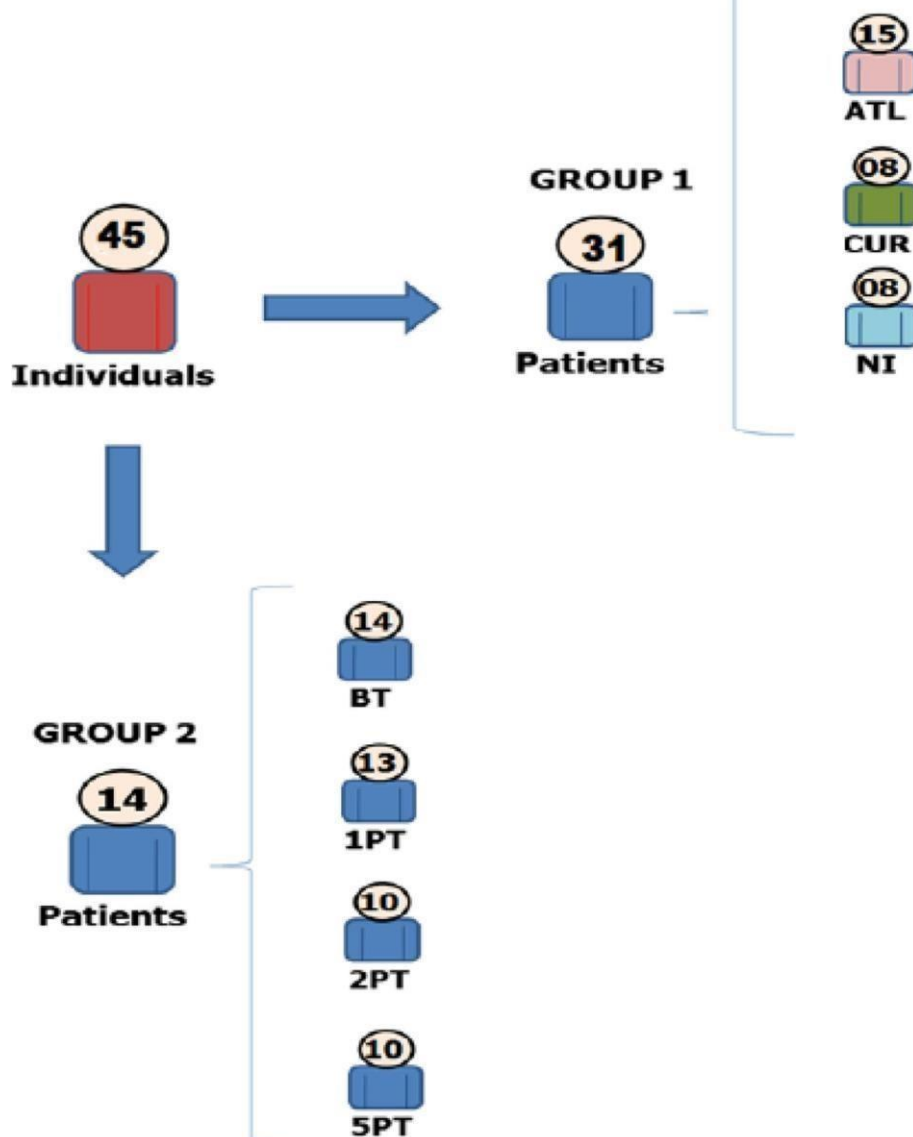


Fig. 1 Design of the study population. Group 1 consisted of 31 individuals, splitted in: patients with American Tegumentary Leishmaniasis (ATL $n=15$), non-infected individuals (NI $n=8$), spontaneously cured patients (CUR $n=8$). Group 2 was formed by patients with ATL before treatment (BT $n=14$). Of these, 13, 10 and 10 individuals performed a new blood collection 1, 2 and 5 years, respectively, post therapeutic (PT) intervention and complete healing of the lesions

For IgG1 acquisition and analysis, the assay was performed according to Rocha et al. (2002). A parasite suspension (5×10^6 /well) was incubated in 96-well U-bottom plates for 30 min at 37 °C with different patients' serum dilutions (1:64 to 1:8192). After this period, the plates were washed twice with 150 μ L of PBS-10% FBS (800 $\times$ g for 10 min, 4 °C). Fifty microliter of human anti- IgG subclasses conjugated to biotin (Sigma Chemical- Corp., St. Louis, MO), were added and the plates were incubated at 37 °C for 30 min. Then, they were washed twice with PBS-10% FBS. Afterwards, the plates were

again stored at 37 °C for 30 min in the presence of 10 μ L of streptavidin conjugated to phycoerythrin (Gibco), diluted at 1:100 in PBS-10% FBS. After this period, the plates were washed and fixed with 200 μ L of fixing solution. The samples were stored for at least 30 min at 4 °C until flow cytometry acquisition. Flow cytometric acquisition (20,000 events per sample) was performed on a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson) and the "CellQuest Pro" software was used for both data storage and analysis. The parasites were identified based on their specific forward (FSC) and side (SSC) light-scattering

properties. Parasites were selected by gating on the FSC × SSC dot-plot distribution. The relative FITC fluorescence intensity for each parasite was analyzed by a single histogram representation. A marker was set on the internal control to confine the nonspecific binding of FITC-conjugated antibody up to 2% and used to determine for each sample the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP) as previously described by Oliveira et al. (2013).

Enzyme-linked Immunosorbent assay - ELISA

The assay was performed following a protocol developed at the Immunogenetics Laboratory of Aggeu Magalhães Institute (FIOCRUZ/PE – Recife – Brazil). The plate was sensitized with 100 µL of the antigen (5 µg/mL) per well, previously diluted in Carbonate/Bicarbonate buffer 0.06 M pH 9.6. The plate was incubated at 4 °C/ 18 h in a humid chamber. After this period, the plates were washed 3 times with PBS 0.015 M pH 7.2 containing 0.05% of tween 20. On the first wash, the supernatant was discarded and on the other 2, the plates stayed with the washing solution for 10 min before discarding. Sera were diluted from 1:40 to 1:1280 in PBS 0.015 M pH 7.2 containing 0.05% of tween 20 and powdered milk. To each plate it was added a negative standard with the same dilutions of the samples, so the mean and standard deviation could be calculated. One hundred microliter of the diluted sera was added per well and the plate was stored at 37 °C for 1 h. The plates were washed again like previously mentioned. One hundred microliter per well of the anti-human IgG (gamma chain specific) conjugated to peroxidase was added on the ideal titer for the test (Calbiochem, 1:2500). Then, the plate was washed as described. One hundred microliter per well of the chromogen (5-amino salicylic acid/OPD) was added. After 1 h of incubation in humid chamber at room temperature, the reaction was quenched with 25 µL per well of NaOH 1 M and the analysis was made in a spectrophotometer at 450 nm wave length. For results interpretation, the reactivity limit of each positive sera was calculated based on the absorbance mean of the negative standard dilutions plus 2 times the standard deviation. Those considered positive were the samples with had higher titers than the result of the calculi described above.

Statistical analysis

Performance indexes were calculated to determine flow cytometry's applicability in diagnosing ATL and assessing spontaneous cure, including “co-positivity” or sensitivity = $([\text{true positive} / \text{real positive}] \times 100)$ and “co-negativity” or specificity = $([\text{true negative} / \text{real negative}] \times 100)$. In addition, data were submitted to the ROC curve analysis to identify the area under the curve (AUC) as the global test's accuracy. The data set was also analyzed by the two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) and Likelihood ratios - LR ($\text{LR}^+ = \text{Se} / (1 - \text{Sp})$ and $\text{LR}^- = (1 - \text{Se}) / \text{Sp}$).

Performance indexes of ELISA and flow cytometry can also be evaluated by classifying the results in four categories according to the presence of lesion (group before treatment - BT) or absence of lesion (group post treatment - PT). These categories were defined as: true positive = presence of lesion and positive test; false-positive = absence of lesion and positive test; false-negative = presence of lesion and negative test and true-negative = absence of lesion and negative test (Table 1). The sensitivity was calculated by the ratio $a/(a + c)$ translating thereby the proportion of patients with ATL (with lesion), that is to say, the proportion of ATL patients who were positive for ELISA or flow cytometry. Regarding specificity, it is related to the proportion of individuals without the clinical manifestations of ATL (no lesion), meaning those who are negative can be determined by the ratio $d/(b + d)$.

Statistical analyses were performed using the MedCalc® statistical software and the Computer Method for Diagnostic Tests – CMDT, version 1.0β (Berlin: Freie Universität Berlin; 1997. Copyright© 1997–1999 Jens Briesofsky).

Results

Applicability and performance indexes of flow cytometry for spontaneous cure assessment and monitoring

Serum samples from 15 patients who were positive for ATL; 8 spontaneously cured (CUR) and 8 healthy individuals (NI) were tested by flow cytometry. The analysis of the mean PPFP values along with the titration curves of anti-fixed promastigote *Leishmania* IgG (from 1:64 to 1:8192) were used to select the 1:1024 serum dilution as previously reported by Pereira et al., 2012 and Oliveira et al. 2013. This serum dilution data also confirmed the

Table 1 Categories for the classification of the patients from the test performance indexes

		ATL	
		BT	AT
Result of test	Positive	TP(a)	FP(b)
	Negative	FN(c)	TN(d)
Total		$\frac{a}{(a + c)}$	$\frac{d}{(b + d)}$

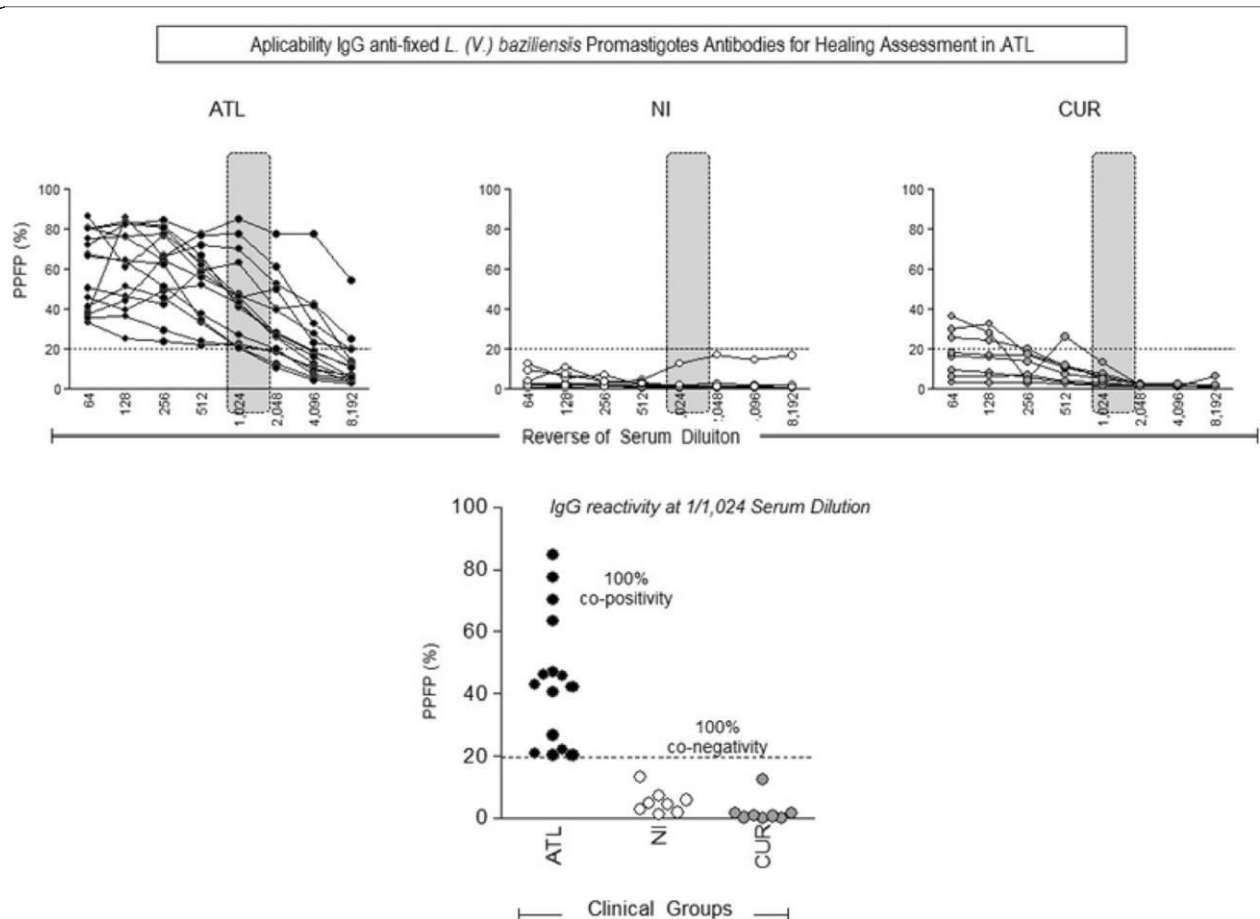


Fig. 2 Titration curve of IgG antibodies anti-fixed *Leishmania braziliensis* promastigotes from the sera of patients with American tegumentary leishmaniasis (ATL ● n = 15); non-infected individuals (NI ○ n = 8) and spontaneously cured patients (CUR ● n = 8) (a). IgG antibodies anti-fixed *Leishmania braziliensis* from serum samples of ATL, NI and CUR groups at the 1/1,024 dilution (b). The results were expressed as percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). The dotted line represents the cut-off point between negative and positive results (cut-off = 20%)

higher segregation range among ATL, CUR and NI group (Fig. 2a). The Fig. 2b showed the co-positivity and co-negativity performance indexes confirming the selection of 1:1,024 sera dilution as the most promising condition to discriminate the PPFP values of ATL from those provided by CUR and NI sera samples using the PPFP = 20% as the cutoff point. These results suggest the applicability of the method for monitoring spontaneous cure of the disease.

ROC curves were constructed to confirm the selection of 1:1,024 sera dilution as the most capable condition to discriminate the PPFP values among the groups (Fig. 3a) as well as to assess the performance of IgG anti-fixed *L. (V.) braziliensis* promastigotes antibodies for spontaneous cure assessment in ATL. The analysis of the area under the curve demonstrated an outstanding performance of the test (AUC = 1.0; IC95%:1.0–1.0). The performance analysis of IgG anti-fixed *L. (V.) braziliensis* promastigote antibodies for spontaneous cure assessment in ATL demonstrated the outstanding performance indexes with 100%

of sensitivity (IC95% = 79–100) and 100% of specificity (95%IC = 78–100) using the PPFP = 20% as the cutoff (Fig. 3b,c). Likelihood ratio (LR) corroborate the performance of IgG anti-fixed *L. (V.) braziliensis* promastigotes antibodies for spontaneous cure assessment in ATL, demonstrating that positive results (PPFP > 20%) has infinite times more chances to come from an ATL patient than NI + CUR individuals. On the other hand, negative results (PPFP < 20%) are unlikely to belong to an ATL individual, strongly suggesting the spontaneous cure (Fig. 3d).

Applicability of flow cytometry for diagnosis in ATL

In order to compare ELISA with flow cytometry for ATL's diagnosis, tests evaluating IgG anti-promastigote forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis* were performed in 14 patients before, and: 13 patients one; 10 patients two and 5 years after treatment. Using a 20% of PPFP cutoff, it was shown that it can be used to identify cutaneous cases of ATL, since it was possible to confirm 86% (12/14) of positivity in patients before treatment;

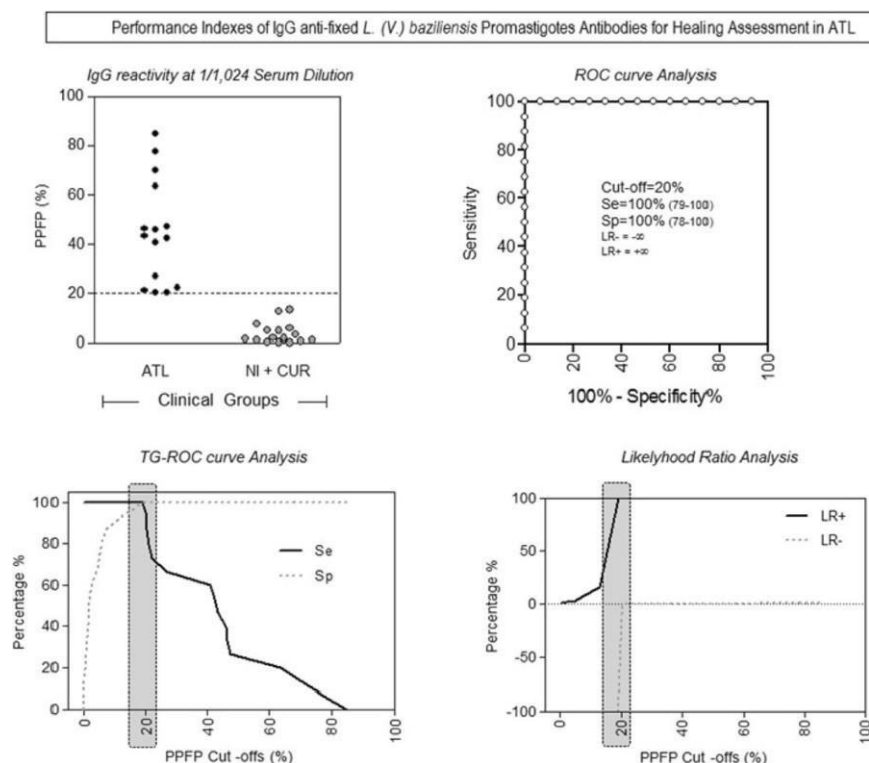


Fig. 3 IgG antibodies anti-fixed *Leishmania braziliensis* from serum samples of ATL, NI + CUR groups at the 1/1024 dilution (a). Confirmation of the cut-off point by the ROC curve analyses, demonstrating the outstanding performance indexes (Sensitivity-Se; Specificity-Sp; Area under the curve-AUC (b,c); and Positive/Negative Likelihood Ratio-LR+/LR- for ATL (d). The results were expressed as percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). The dotted line and grey bars represents the cut-off point between negative and positive results (cut-off = 20%)

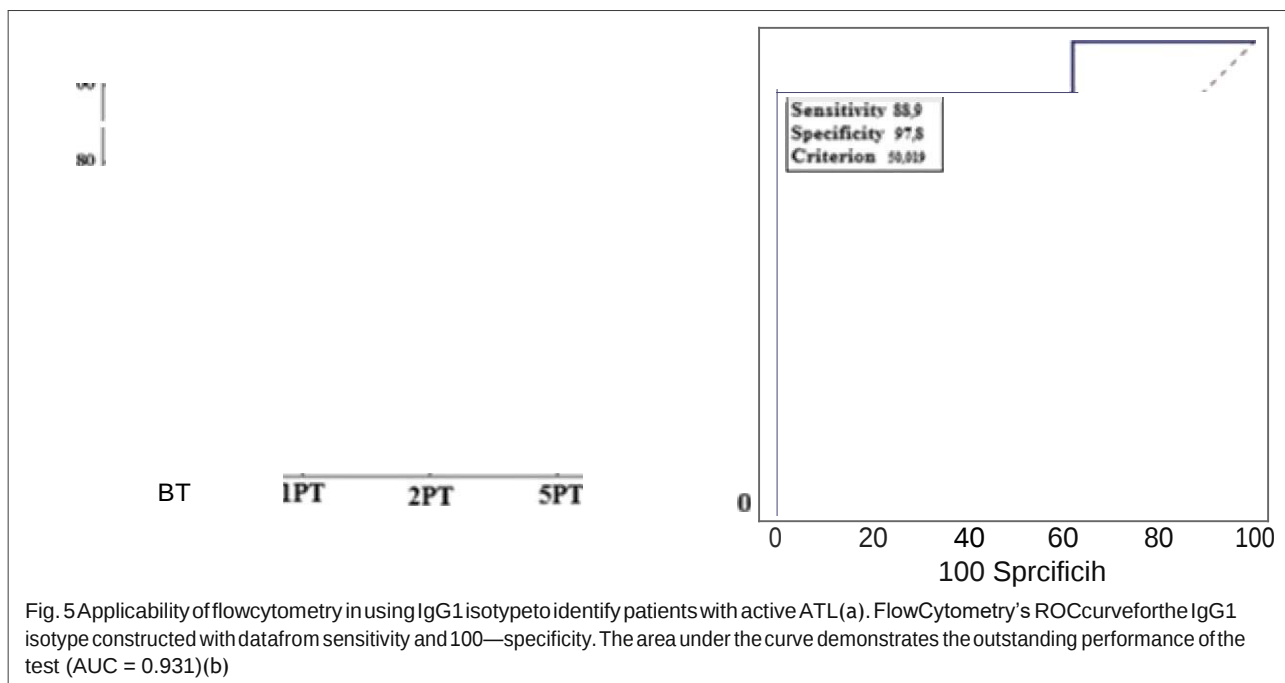
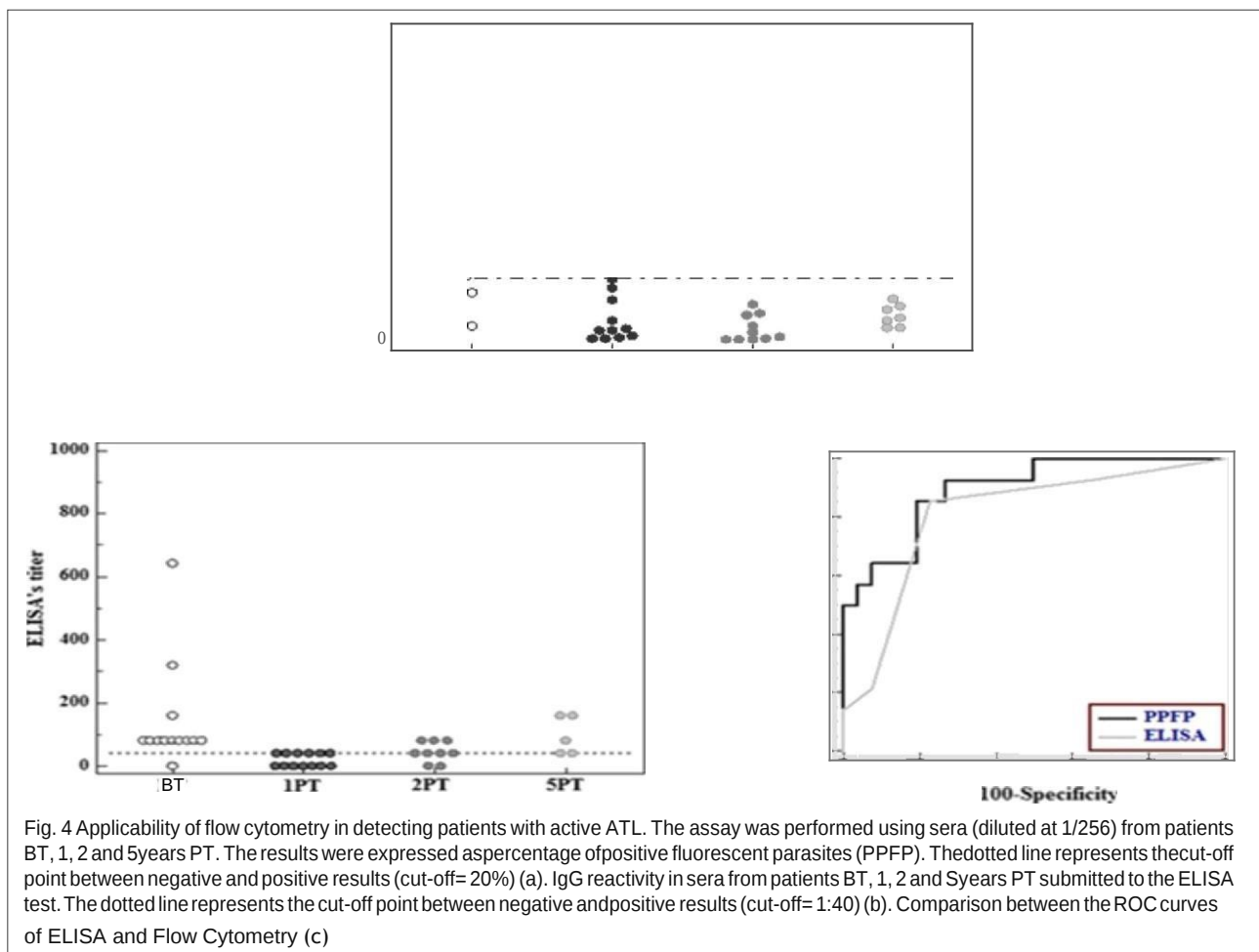
and 77% (10/13), 80% (8/10) and 70% (7/10) of negativity, respectively, in patients one, two and 5 years after treatment (Fig. 4a).

Serial dilutions of the patients' sera were added to the plates ranging from 1:40 to 1:1280. The patients who presented serum titers from 1:40 were considered positive for the ELISA test. From the evaluated sera, 92.8% (13/14) of the patients before treatment with Glucantime® were positive; 53.8% (7/13) were positive 1 year after treatment; 88.8% (8/9) were positive 2 years after treatment and 100% (5/5) of the patients 5 years after treatment remained positive for ATL in this test. To evaluate ELISA's applicability in identifying active ATL, values of the dilution's titer in which the patients were considered positive were plotted into a graph using the software MedCalc Statistical. It was possible to evaluate IgG reactivity in patients' sera before and after treatment, as observed on the Fig. 4b. The chosen serum titers of ELISA and flow cytometry were used for the ROC curves (Fig. 4c). Based on the analysis of the ROC curve, it was possible to observe that ELISA's AUC (ASC=0.808; IC_{95%}=0.652–0.915) was lower than flow cytometry's (ASC = 0.896; IC_{95%} = 0.758–0.970). Thus, we can assure that flow cytometry had a better performance with a superior accuracy.

After identifying the reactivity region and the cutoff, the confirmation of the test's applicability was performed by detecting positive and negative patients. It was observed that in patients BT, 63.2% were positive; in patients 1 year after treatment, 17.7%; 2 years, 72.8% and in patients 5 years after treatment, 12.5%. These results can be observed in Fig. 5a. The values of the titer results from flow cytometry in the dilution 1:256 of the control sera were used to construct the ROC curve to evaluate the test's accuracy (Fig. 5b). With the ROC curve analysis, it was observed that the AUC of flow cytometry was = 0.931; IC_{95%} = 0.698–0.997 showing that the test had an excellent performance.

Discussion

The present work evaluated the detection of IgG antibodies anti-fixed *L. (V.) braziliensis* promastigotes by flow cytometry to identify active infection and spontaneous cure. We also suggested the use of the IgG1 isotype as an alternative tool for diagnosis and cure criterion of ATL. Several serological methods are able to diagnose and monitor ATL clinical cure by assessing the decrease of the parasite load after the complete healing of the lesions [31, 32]. Previously, Romero et al. (2005) demonstrated a



decrease in reactivity levels of IgG after specific treatment, showing that ELISA has a better performance when compared to the IFA test. However, the cure criteria for ATL remain controversial, since the persistence of positivity in conventional serological tests can be observed after spontaneous or therapeutic cure.

Several efforts have been made aiming to build up a more reliable serological approach by using distinct antigen preparations to detect anti-*Leishmania* antibodies [33–35]. The spontaneously cured patients (CUR) are the target of immunological research possibly because they present a differential and more efficient protective response when compared to the cases of active ATL infection [9, 36]. Our results from CUR group showed a high performance of the method, presenting low reactivity of PFP (PFP < 20%) similar with NI individuals. The infection by *L. (V.) braziliensis* tends to be difficult to heal and sometimes it can evolve to the mucosal form. However, the spontaneous cure of the lesions suggests the development of an immune response capable of controlling the infection by *Leishmania* [9]. Previous studies showed that spontaneously cured patients present low levels of IgG antibodies, and that correlates to the decrease of the parasite load. Thus, the low reactivity of antibodies showed by CUR patients in the present work suggests that our method can be useful for clinical cure monitoring. These findings agree with other authors that have also shown that low levels of antibodies after therapy can indicate a successful cure [37–39].

Researchers have aimed to overcome the limitations of ATL serological diagnosis by using alternative antigenic preparations to detect *Leishmania* antibodies [32, 33]. The use of live promastigotes would represent a useful tool to increase specificity, since only external membrane epitopes are accessible for IgG binding, avoiding cross reactivity with intracellular components commonly distributed among trypanosomatids [40, 41]. On the other hand, the use of fixed promastigotes represents a practical way to store a massive amount of antigenic support that contributes to a large-scale production. Moreover, the risk of infection during the manipulation of live parasites supports the use of fixed preparations as an antigen source for serological tests. Bittencourt et al., 1968 suggested the possibility of antibody search as a way to monitor ATL cure [42]. In 2001, Brito and colleagues observed increased levels of IgG in spontaneously cured patients, using immunoblot analysis with antigens from soluble and insoluble fractions of the parasite, suggesting an interest in evaluating whether the dynamics of the antibody response could be useful to monitor clinical cure of ATL or not. However, Pereira and colleagues have demonstrated that flow cytometry was not able to detect changes in the anti-*Leishmania* IgG reactivity. A novel methodological approach by

delta-reactivity pattern represents a plausible method for post-therapeutic monitoring of ATL at early stages (1 month - 24 months) and after the end of etiological treatment assessment [43]. The proposed strategy analyzed the differential PFP reactivity detected by paired samples (delta-reactivity), which represents the difference between PFP after and before treatment. Therefore, serological tests are very important alternatives for monitoring clinical cure, especially because spontaneously cured patients present a decrease in the parasite load and in IgG antibody reactivity [9] and can be identified by flow cytometry technique.

Comparing the performances and accuracies of flow cytometry and ELISA, flow cytometry was shown to be more sensitive and specific as it is observed through the analysis of the ROC curves, showing that if this test is validated, it can be a potential candidate to be used in the laboratorial routine. In fact, this tool can be applicable for cure monitoring of ATL when performed after the end of the etiological treatment. This study demonstrated that flow cytometry was able to distinguish IgG reactivity in patients with active ATL from those who had 1 to 5 years of the end of their treatment. Rocha and Gontijo et al., 2002 reported a reactivity of 21.5% for IFI in individuals without clinical manifestations of ATL who lived in endemic areas for the disease. Although cutaneous lesions caused by *L. (V.) braziliensis* are usually susceptible to antimonial treatment and complete healing occurs at the end of the therapy, the occurrence of relapses strengthens the suggestion that when anti-*Leishmania* antibodies after treatment persist, it could indicate the presence of the parasite and be a predictive factor in ATL's recurrence [43]. Therefore, we attribute the false-positives 2 years after treatment on flow cytometry to the possibility of reinfection since they live in endemic areas and are immunologically sensitized [36]. Nevertheless, the possibility of cross reactions with other trypanosomatids cannot yet be discarded. Silva et al., 2019 showed that highly specific techniques have to adjust their methods in order to improve their performances as tools for diagnostic confirmation. Regarding the applicability evaluation of IgG1, it was observed that even with the need of a higher number of samples, this approach opens perspectives for its use as a diagnostic tool, as well as for the cure criterion of ATL.

Variables in the quantitative determination of fluorescence intensity were already mentioned, being necessary a careful attention to them during the design phase of the technique's standardization. These variables involve instruments, antibody (specificity, affinity), samples (type, interfering medications and processing), standardization of the method, analysis and interpretation [44]. However, flow cytometry is one of the most powerful approaches to analyze several kinds of samples in a short period of time,

which gives valuable information about the question of interest [23]. Flow cytometry has enabled many assay possibilities, including the serological diagnosis of ATL. It can also be scaled up by using microtiter plates and since it has a high throughput apparatus, it allows the diagnosis of several patients simultaneously [45].

Over the years, many efforts have been made to develop flow cytometers in order to reduce their cost, size and complexity and also to increase their sensitivity [46]. Researchers have reported different flow cytometry platforms, such as an integrated HyperCyt platform on CyAn (Beckman Q3 Coulter), FacScan, and Accuri C6 (BD Bioscience) flow cytometers, as well as the commercial iQue Screener (Intellicyt Corporation, Albuquerque, NM, USA) [45, 47].

Conclusions

In summary, the performance observed by flow cytometry in the present study strongly reinforces the possibility of using it as an alternative diagnosis for ATL. Through the analyses of the ROC curves, we verified that flow cytometry was superior to ELISA, a test which is used on the laboratorial routine for ATL. We highlight also that there is a possibility of using this methodology as a cure criterion since it was possible to distinguish patients with the active disease from those who were cured. Also, with the data obtained until now, we suggest that the IgG1 isotype can also be applied to ATL's diagnosis since it was positive in patients with the active disease. Overall, our data suggest the potential and applicability of flow cytometry-based methodologies as an alternative serological diagnosis for ATL. These results open up new avenues of research using flow cytometry, such as understanding the humoral response in the active infection and in patients cure monitoring.

Abbreviations

ATL: American Tegumentary Leishmaniasis; CUR: Subjects spontaneously cured ATL; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; NI: Non-infected controls; PCR: Polymerase chain reaction; PPFP: Percentage of positive fluorescent parasites

Acknowledgements

The authors are grateful to LF da Rocha for technical assistance and to the Leishmaniasis Reference Service of IAM/ FIOCRUZ for the support.

Authors' contributions

APOM and BCO worked throughout the entire project, drafted the paper and performed the final corrections. AMSP worked throughout the entire project, MEFB, MCABC and MAS participated in the field work and elaboration of the paper. FFA and ATC participated in the analysis of the results and elaboration of the paper. OAMF and VRAP participated in the analysis of the results, elaboration of the paper and performed the final corrections. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the State of Pernambuco Research Foundation (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Brazilian National Research Council (CNPq) and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ). FACEPE and CAPES were responsible for the

fellowships awarded to the PhD and Master students who were developing this project. Through a CNPq (Universal 14/2014) and a FIOCRUZ (Tesouro) award, our group had the financial support to obtain materials and reagents used in this study.

Availability of data and materials

We affirm that the all data and materials which were generated and analyzed during this study are included in this published article. And also, that the datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

Ethics approval and consent to participate

All individuals agreed and signed the "Term of Free and Informed Consent". All individuals agreed and signed the "Term of Free and Informed Consent". CPqAM/Fiocruz (Protocol no. 001300950000-7). The Aggeu Magalhães Institute Research Ethics Committee has approved the experimental protocols.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco CEP: 50670-420, Brazil. ²Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, Pernambuco, Brazil. ³Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Recife, Pernambuco, Brazil. ⁴Instituto René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Received: 3 September 2018 Accepted: 20 November 2019

Published online: 29 November 2019

References

- Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Esmenjaud JR, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. Published online: 26 May 2017. doi: <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1> 2017.
- Murback ND, Hans Filho G, Nascimento RA, Nakazato KR, Dorval ME. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *An Bras Dermatol*. 2011;86:55–63. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000100007>.
- Dias DS, Ribeiro PAF, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lage DP, et al. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitol Int*. Published online: 3 Feb. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.02.001>.
- Brito MEF, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, et al. Species diversity of *Leishmania* (Viannia) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health*. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02361.x>.
- Zulfigar B, Shelper TB, Avery VM. Leishmaniasis drug Discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discov Today*. Published online: 21 June. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>.
- Paniz-Mondolfi AE, Talhari C, García Bustos MF, Rosales T, Villamil-Gomez WE, Marquez M, et al. American cutaneous leishmaniasis in infancy and childhood. *Int J Dermatol*. 2017. <https://doi.org/10.1111/ijd.13664>.
- Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, Silva-Junior RM, Guerra JAO, Ferreira LCL, Talhari S. Estudo clínico randomizado comparando antimonio de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol*. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600005>.
- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:71–80.
- Brito ME, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FG. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:203–6.

10. Wijerathna T, Gunathilaka N, Gunawardana K, Rodrigo W. Potential challenges of controlling leishmaniasis in Sri Lanka at a disease outbreak. *Biomed Res Int*. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6931497>.
11. O'Neil CE, Labrada M, Saravia NG. Leishmania (Viannia) panamensis-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1993. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.49.181>.
12. Rodriguez V, Centeno M, Ulrich M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. *Parasite Immunol*. 1996;18:341–55.
13. Carvalho LP, Soto M, Jerônimo S, Dondji B, Bacellar O, Luz V, Orge Orge G, et al. Characterization of the immune response to Leishmania infantum recombinant antigens. *Microbes Infect*. 2003;5:7–12.
14. Souza AP, Soto M, Costa JM, Boaventura VS, de Oliveira CI, Cristal JR, et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using Leishmania recombinant proteins. *PLOS One*. Published online: 12 June. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066110>.
15. Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Souza MA, Oliveira BC, Mendes APO, Pereira VRA, Paiva-Cavalcanti M. Epidemiological, clinical and laboratory diagnosis of Trypanosomiasis. In: Paiva-Cavalcanti M, Pereira VRA, editors. *Tropical diseases: Na overview of major diseases occurring in the Americas*. Bentham Science Publishers: Bentham; 2017. p. 1–50.
16. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8:419–33.
17. Bensousan E, et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1435–9.
18. Brandão-Filho SP, et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Transact Royal Med Hygiene*. 1999;93:488–94.
19. Reithinger R, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:581–96.
20. Paiva-Cavalcanti M, Morais RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque SC, Tavares DHC, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*. Published online: 17 June. 2015. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>.
21. Vega-López F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16:97–101.
22. Passos VMA, et al. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. *Bull World Health Organ*. 2000;78:968–74.
23. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;37:163–76. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>.
24. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. New York: Wiley; 2003.
25. Silva ED, et al. Performance evaluation of anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral Leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.02.009>.
26. Cozzolino I, Rocco M, Villani G, Picardi M. Lymph node fine-needle cytology of non-hodgkin lymphoma: diagnosis and classification by flow cytometry. *Acta Cytol*. Published online: 24 Aug. 2016. <https://doi.org/10.1159/000448389>.
27. Davidson B. Malignant nonhematological effusion characterization by flow cytometry. *Acta Cytol*. Published online: 18 Aug. 2016. <https://doi.org/10.1159/000447687>.
28. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. Published online: 5 Sep. 2012. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.122>.
29. Rocha RDR, Gontijo CMF, Elói-Santos SM, Carvalho AT, Corrêa-Oliveira R, Marques MJ, et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de Leishmania (Viannia) braziliensis, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa de leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35:551–62.
30. Martins-Filho AO, Pereira ME, Carvalho JF, Cançado JR, Brenner Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypanomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995;2:569–73.
31. Romero GA, de la Glória Orge Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira MV, de Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by Leishmania (Viannia) braziliensis or Leishmania (Viannia) guyanensis in Brazil. *Acta Trop*. 2005;93:49–56.
32. Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of Leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis*. 2004;189:1018–23. <https://doi.org/10.1086/382135>.
33. Gonçalves CCM, Reiche EM, De Abreu Filho BA, Silveira TG, Felizardo TC, Maia KR, et al. Evaluation of antigens from various Leishmania species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:91–102.
34. Celeste BJ, Angel SO, Castro LGM, Gidlund M, Goto H. Leishmania infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1591–3. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004001100001>.
35. Rocha RD, Gontijo CM, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Ferrari TC, et al. Clinical value of anti-live Leishmania (Viannia) braziliensis immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2006;11:156–66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01552.x>.
36. van der Snoek EM, Lammers AM, Kortbeek LM, Roelfsema JH, Bart A, Jaspers CA. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to Leishmania naiffi in two Dutch infantry soldiers. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34:e889–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2009.03658.x>.
37. Lemos EM, Gomes IT, Carvalho SF, Rocha RD, Pissinatti JF, Martins-Filho OA, Dietze R. Detection of anti-leishmania (Leishmania) chagasi immunoglobulin G flow cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:569–76. <https://doi.org/10.1128/CDVI.00354-06>.
38. Pissinatti JF, Gomes IT, Peruhype-Magalhães V, Dietze R, Martins-Filho OA, Lemos EM. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-Leishmania immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *J Immunol Methods*. 2008;336:193–202. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.04.018>.
39. Oliveira AP, de Castro MC, de Almeida AF, Souza Mde A, de Oliveira BC, Reis LC, et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live Leishmania (Viannia) braziliensis immunoglobulin G. *J Immunol Methods*. 2013;387:245–53. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.11.002>.
40. Andrade ZA. The challenge of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988;83:484–5.
41. Chiaramonte MG, Frank FM, Furer GM, Taranto NJ, Margni RA, Malchiodi EL. Polymerase chain reaction reveals Trypanosoma cruzi infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. *Acta Trop*. 1999;72:295–308.
42. Bittencourt AL. Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1968;10:247–52.
43. Pereira VRA, Reis Lde C, Souza Mde A, de Oliveira AP, de Brito ME, Lage PS, et al. Evaluation of anti-live and anti-fixed Leishmania (Viannia) braziliensis promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74:292–8. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.025>.
44. Maher KJ, Fletcher MA. Quantitative flow cytometry in the clinical laboratory. *Clin Appl Immunol Rev*. 2005;5:352–72.
45. Ding M, Kasperowski K, Murray D, Bardelle C. High-throughput flow cytometry for drug discovery: principles, applications, and case studies. *Drug Discov Today*. 2017;0:1–7.
46. Nolan JP, Condello D. Spectral flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2014;27:1–18. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0127s63>.
47. Marrone LB. Flow Cytometry: A multipurpose technology for a wide spectrum of global biosecurity applications. *Feature Story*. 2009:148–56. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2009.03.001>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

APÊNDICE E - ARTIGO PUBLICADO 2

*Brazilian Journal of health Review***O uso da citometria de fluxo como critério de cura e aplicabilidade diagnóstica na leishmaniose tegumentar americana (LTA)****The use of flow cytometry as a criteria for healing and diagnostic applicability in american tegumentary leishmaniosis (LTA)**

Recebimento dos originais: 02/11/2018

Aceitação para publicação: 04/12/2018

Allana Maria de Souza Pereira

Discente do curso de graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - Recife/PE.
Email: allanamariasp@gmail.com

Beatriz Coutinho de Oliveira

Biomédica, Doutoranda em Inovação Terapêutica, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE. Av. Prof Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife – PE
Email: oliveira.cbeatriz@gmail.com

Andresa Pereira de Oliveira Mendes

Bióloga, Doutora em Inovação Terapêutica, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE. Av. Prof Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife - PE.
Email: andresadeolinda@gmail.com

Valéria Rêgo Alves Pereira

Biomédica, Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, Pesquisador do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE, Brasil. Av. Prof Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife – PE.
Email: valeriaph@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da resposta imune humoral no desenvolvimento de lesões cutâneas e na resposta ao tratamento em indivíduos portadores de LTA através da citometria de fluxo. Foi realizado um estudo primário, analítico e experimental com ensaios in vitro. Amostras de soros foram inativadas e formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foram obtidas a partir da cepa de referência, expandidas em meio Schneider's até atingir a fase exponencial. Após diversas etapas, uma alíquota de parasitos foi contada e a concentração ajustada para os ensaios de citometria de fluxo. Como resultados da avaliação da aplicabilidade da Imunoglobulina G em detectar pacientes com LTA ativa, dos 51 pacientes testados, 83,23% foram considerados positivos. Os pacientes foram tratados com a dose 15ml/kg de Glucantime, durante 20 dias, correspondente a um ciclo da medicação. Após 5 meses de tratamento, foi realizado um ensaio com o soro desses pacientes após o tratamento (PT) e foi comparado com os ensaios realizados antes do tratamento (AT). Não houve diferença significativa em relação aos títulos AT e PT. Por conseguinte, com os resultados obtidos, pode-se sugerir que a IgG é aplicável ao diagnóstico da LTA, uma vez que o teste se mostrou positivo para pacientes com a forma ativa da doença, contribuindo para uma técnica mais específica. Para obter uma diferença significativa entre os

títulos AT e PT e determinar um critério de cura laboratorial, é necessário um intervalo de tempo maior para o tratamento, permanecendo como perspectiva continuar o acompanhamento dos pacientes, avaliando-se a redução dos seus títulos.

Palavras- chaves: L.V.braziliensis; Imunologia; Isotipos; Diagnóstico; Anticorpos

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the participation of the humoral immune response in the development of skin lesions and the response to treatment in individuals with ATL by flow cytometry. A primary, analytical and experimental study was carried out with in vitro assays. Serum samples were inactivated and promastigote forms of *Leishmania* (V.) *braziliensis* were obtained from the reference strain, expanded in Schneider's medium until reaching the exponential phase. After several steps, an aliquot of parasites was counted and the concentration adjusted for the flow cytometry assays. As a result of the evaluation of the applicability of immunoglobulin G to detect patients with active ACL, of the 51 patients tested, 83.23% were considered positive. Patients were treated with the 15ml / kg Glucantime dose for 20 days, corresponding to one cycle of the medication. After 5 months of treatment, a serum test of these patients was performed after treatment (PT) and compared with the pre-treatment (AT) tests. There was no significant difference in relation to AT and PT titers. Therefore, with the results obtained, it can be suggested that IgG is applicable to the diagnosis of ATL, since the test was positive for patients with the active form of the disease, contributing to a more specific technique. In order to obtain a significant difference between the AT and PT titers and to determine a laboratory cure criterion, a longer treatment period is necessary, with the aim of continuing the follow-up of the patients, evaluating the reduction of their titers.

Keywords: L.V.braziliensis; Immunology; Isotypes; Diagnosis; Antibodies

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, considerada emergente e negligenciada. É endêmica em 98 países, distribuída em quatro continentes: Ásia, África, Europa e América apresentando uma média de 1,3 milhões de casos anuais. No Brasil é considerada a segunda doença de maior prevalência, com casos confirmados em todos os estados, sendo as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste consideradas endêmicas para a doença (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994; TIUMAN *et al.*, 2011; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

Essa infecção tem como agente causador protozoários de diversas espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*, onde a espécie *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* é considerada o agente específico da LTA no Brasil, e é transmitida por insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) (SAVOIA, 2015; BRASIL, 2017). Essa doença é responsável por desencadear infecções assintomáticas, pode comprometer a pele com lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas, como também, pode se apresentar em formas mais graves com lesões nas mucosas, denominada de forma mucocutânea (SOUZA *et al.*, 2013; ARONSON, 2016).

Já foi descrito que o mecanismo protetor da LTA é dependente de células T e existe uma diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção relacionada com o nível de expansão de células T do tipo TH1 ou TH2 (BACELLAR *et al.*, 2002; DE LUCA; MACEDO, 2016). Estudos sobre a resposta imune humoral na LTA demonstram o papel dessas células como células apresentadoras de antígeno (APCs), na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, como também, promovendo a lise dos parasitos em sinergia com o sistema complemento (PEDRAS *et al.*, 2003; FAGUNDES SILVA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015). Assim, a análise de anticorpos anti-*Leishmania* permite avaliar o curso evolutivo da infecção e fornecer dados sobre as características da resposta imune. Diversos perfis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* têm sido detectados em pacientes com LTA em todas as manifestações clínicas e a intensidade da resposta está relacionada com a carga parasitária, espécie do parasito, cronicidade da infecção e a fatores intrínsecos do próprio hospedeiro (TRUJILLO *et al.*, 2000; REIS, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; ROMERO GA *et al.*, 2005).

Pesquisas já correlacionaram as diversas manifestações clínicas de LTA com as diferentes subclasses de IgG, como nas leishmanioses cutânea e mucocutânea a resposta do tipo Th1 tem sido associada com a presença de isotipos IgG1, IgG2 e IgG3, já a resposta do tipo Th2 está atrelada com a presença de IgG4 para a leishmaniose cutânea difusa (SOUZA *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 1996).

O diagnóstico das leishmanioses é comumente realizado por uma associação de fatores, com base em características clínicas, dados epidemiológicos e testes laboratoriais. Como já mencionado, as leishmanioses podem se apresentar sob diversas formas clínicas, onde essas características são facilmente confundidas com outras doenças como: câncer de pele, esporotricose, sífilis, entre outras (REITHINGER *et al.*, 2007, FERREIRA, 2018). Assim, um diagnóstico precoce e diferencial, com redução nos níveis de reatividade cruzada com outras doenças semelhantes, se mostra uma medida crucial para o controle da LTA. Devido ao fato de que não existe uma técnica de diagnóstico considerada padrão-ouro um grande número de técnicas para o diagnóstico laboratorial foi descrito na literatura variando na precisão dos resultados (GOTO, 2010).

A citometria de fluxo é uma tecnologia que vem sendo estudada para ser implementada ao diagnóstico, tecnologia que promove a análise simultânea de diferentes características físicas de partículas individuais, conforme um fluxo de fluido desloca-se através de um feixe de luz, possibilitando detecção e análise quantitativa de anticorpos (PEDRAL-SAMPAIO *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). A técnica apresenta vantagens em relação aos outros imunoensaios, como a possibilidade de quantificação do analito, volume reduzido de amostra, grande reprodutibilidade e sensibilidade, além de capacidade para multiplexagem (SOUSA *et al.*, 2013). Simultaneamente

estudos têm avaliado a redução dos níveis de anticorpos em pacientes de LTA após tratamento quimioterápico, esse fato impulsionou o uso da citometria de fluxo para além de diagnosticar, estabelecer um critério de cura (PEREIRA, V. R. et al., 2012, DE OLIVEIRA et al., 2013).

Diante das perspectivas oferecidas por citometria de fluxo relatado por Martins- Filho et al., (1995), e considerando que o uso de isotipos pode colaborar com uma maior acurácia nos testes (PISSINATE *et al.*, 2008), o atual projeto tem como objetivo avaliar, através de citometria de fluxo, a participação da resposta imune humoral no desenvolvimento de lesões cutâneas e na resposta ao tratamento em indivíduos portadores de LTA. Contribuindo para a obtenção de um método de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade e como uma ferramenta para determinação de um critério de cura para a doença.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Um estudo primário, analítico e experimental com ensaios *in vitro* foi realizado e avaliados 51 soros de pacientes procedentes de de Moreno, Zona da Mata de Pernambuco, considerada área endêmica para LTA. Eles eram portadores de lesões ativas, de ambos os sexos e com idade superior a 15 anos. Esses pacientes receberam atendimento no ambulatório do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), onde ficaram cientes do objetivo do estudo e concordaram em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE). Além dos pacientes citados, adicionou-se ao estudo soros de pacientes após início do tratamento quimioterápico com a dose 15ml/kg da droga Glucantime. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/FIOCRUZ (CAAE 11083812.7.0000.5190). Se obteve o soro através da centrifugação das amostras de sangue em temperatura ambiente, e depois inativado em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Para obtenção das formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, utilizou-se uma amostra da cepa de referência, expandida em meio Schneider’s até atingir a fase exponencial. Após diversas etapas, realizou-se uma contagem da alíquota de parasitos e a concentração ajustada para os ensaios de citometria de fluxo. O ensaio de citometria de fluxo foi realizado de acordo com Rocha *et al.* (2002). Utilizando uma placa de 96 poços com o fundo em “U”, incubou-se uma alíquota de parasitas na placa a 37°C por 30 minutos na presença de diferentes diluições do soro (1:64 a 1:8192). Após incubação com soros, ocorreram duas lavagens dos parasitos com 150 µ de PBS-10% SFB (1000 X g por 10 minutos, a temperatura ambiente). Em seguida, os parasitos incubados a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz, com a imunoglobulina G, lavados duas vezes e posteriormente incubados nas mesmas condições com o fluorocromo estraptavidina-ficoeritrina (PE) (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) diluída 1:200 em PBS-10% SFB. Após as lavagens, os parasitos marcados foram fixados com 200uL de solução fixadora e mantidos por até 24 horas a

4°C, ao abrigo de luz, até a leitura no citômetro de fluxo. A análise estatística dos dados ocorreram no Laboratório de Métodos Quantitativos do Núcleo de Saúde Coletiva do IAM FIOCRUZ-PE, empregando-se testes não paramétricos. Todas as conclusões tomadas consideraram um nível de significância de 95%. Os gráficos construídos utilizaram o software MedCalc Statistical para avaliar e o desempenho dos testes, sensibilidade e especificidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

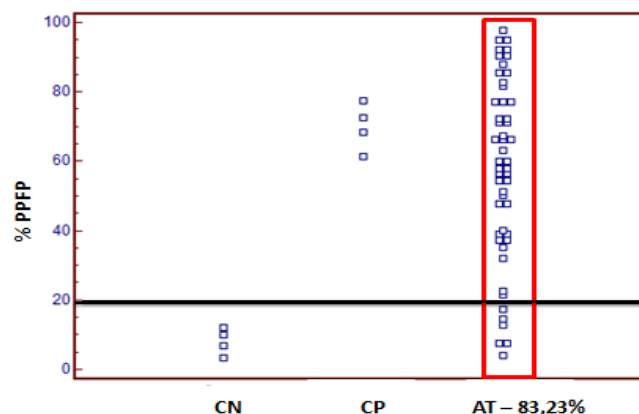
3.1. Aplicabilidade da imunoglobulina G na detenção de pacientes com LTA

No presente estudo propusemos a utilização da citometria de fluxo como uma ferramenta para ser implementada no diagnóstico e também para o critério de cura da LTA através do uso da imunoglobulina G. Uma das grandes dificuldades no controle da LTA está associada ao fato de que ainda não existe uma técnica de diagnóstico que seja considerada o padrão-ouro e o diagnóstico final é obtido através de uma associação de fatores clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (NEVES, 2002). Guitierrez (1991) demonstrou que ao realizar uma análise de anticorpos anti- *Leishmania* é possível avaliar o curso da infecção, como também fornece dados sobre características da resposta imune. Com isso, estudos tem focado na análise desses anticorpos e diversos perfis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* foram detectadas em pacientes portadores de LTA, em todas as manifestações clínicas da doença. Pissinate et al., 2008 observou que todos os isotipos específicos anti-*Leishmania*, exceto IgD, são detectados no soro de pacientes com LTA e que o uso dos isotipos de IgG aumentam a eficiência da técnica de citometria de fluxo para o diagnóstico.

Assim, para avaliar a aplicabilidade do isotipo IgG em identificar pacientes portadores de LTA ativa, foram utilizados 51 amostras de soros de pacientes e aqueles que apresentaram a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) >20% foram considerados positivos no ensaio de citometria de fluxo, onde o teste conseguiu identificar como positivo 88,23% dos pacientes testados antes do tratamento (AT), como demonstrado na Figura 1. Esse resultado corrobora com estudos semelhantes que utilizam a citometria de fluxo para diagnosticar pacientes portadores de LTA, como os trabalhos de PEREIRA *et al.* (2012) e OLIVEIRA *et al.* (2013). Onde, através da citometria de fluxo (CF) detectaram anticorpos anti-*Leishmania* circulantes para identificar indivíduos com doença ativa e monitorar a cura após-tratamento quimioterápico da LTA, utilizando parasitos vivos e parasitos mortos fixados. Esses resultados vem impulsionando a idéia do uso dessa tecnologia como uma técnica para diagnosticar essa doença, uma vez que já é utilizado para diagnosticar outras doenças como alguns tipos de câncer, segundo descrito por KEENEY;

HEDLEY; CHIN-YEE (2017). A reatividade do ensaio de citometria de fluxo foi testada em ensaios anteriores do grupo (OLIVEIRA, 2013), a partir das diluições testadas do conjugado IgG (1:100 a 1:6400), obtidas após incubação com os soros CP (controle positivo) e com soros CN (controle negativo), nas diluições de 1:64 a 1:8192, com promastigotas fixadas, em condições previamente padronizadas.

Figura 1 - Avaliação da aplicabilidade do anticorpo IgG na identificação de pacientes com LTA ativa.



Fonte: Elaborado pela autora pelo programa MedCalc Statistical. **Nota:** Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG para o ensaio de citometria de fluxo.

3.2. Avaliação de pacientes após 5 meses de tratamento

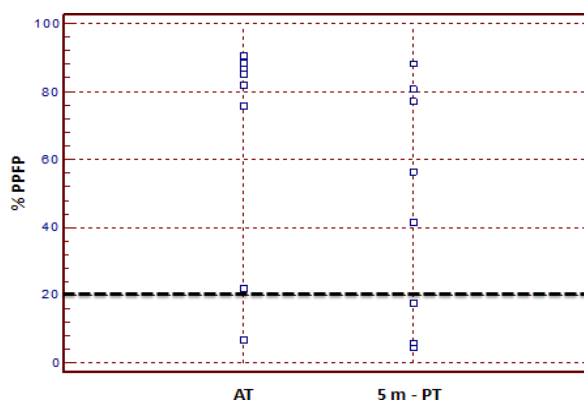
O critério de cura atual para a LTA é clínico, com a cicatrização completa das lesões e com isso diversas abordagens vêm sendo estudadas na tentativa de implementar um método para acompanhamento do paciente após o tratamento quimioterápico e determinar um critério de cura laboratorial. Com essa perspectiva, os testes sorológicos demonstram um papel importante como um indicador para monitoramento da evolução do paciente até a cura. Brito e colaboradores (2001) observaram uma redução nos títulos de IgG após os pacientes iniciarem o tratamento quimioterápico. Trabalhos como os de Amato e colaboradores (1998) e o de Mendonça e colaboradores (2004) sugerem o uso das técnicas de IFI e ELISA como abordagens sorológicas para acompanhamento do paciente e posteriormente comprovar a cura, através da avaliação quantitativa de anticorpos IgG no soro, ao longo do seu tratamento. GOMES *et al.*, 2014 descreveu algumas limitações que ambas as técnicas podem apresentar, principalmente ligada a baixa sensibilidade, especificidade e presença de reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos dificultando o uso dessas técnicas para determinar um critério de cura.

Desse modo, para avaliar a aplicabilidade do isotipo IgG como critério de cura para pacientes portadores LTA após início do tratamento quimioterápico, foi realizado um ensaio inicial

comparativo utilizando amostras de 8 pacientes antes do tratamento e amostras dos mesmos pacientes após 5 meses do início do tratamento. Esses pacientes estavam sendo tratados com uma dose de 15ml/kg da droga Glucantime por 20 dias, que corresponde a um ciclo da medicação. Para os resultados, aqueles que apresentaram a porcentagem de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) >20% foram considerados positivos no ensaio de citometria de fluxo. O teste conseguiu identificar como positivo 87,5% (7/8) dos pacientes testados antes do tratamento (AT), como demonstrado na Figura 2. Para os pacientes 5 meses após início do tratamento, o teste identificou como positivo 62,5% (5/8) dos pacientes (Figura 2). A reatividade do ensaio de citometria de fluxo foi testada em ensaios anteriores do grupo (OLIVEIRA, 2013), a partir das diluições testadas do conjugado IgG (1:100 a 1:6400), obtidas após incubação com os soros CP (controle positivo) e com soros CN (controle negativo), nas diluições de 1:64 a 1:8192, com promastigotas fixadas, em condições previamente padronizadas.

A partir desses resultados novamente é possível observar que a citometria de fluxo é aplicável ao diagnóstico da LTA, pois a técnica identificou 87,5% do total de pacientes, porém para os pacientes após o tratamento os títulos não demonstraram diferenças significativas em relação as amostras obtidas antes do início do tratamento. Novamente, os trabalhos de PEREIRA *et al.* (2012) e OLIVEIRA *et al.* (2013), avaliaram a possibilidade do uso da citometria de fluxo como ferramenta para analisar a redução dos níveis de anticorpos utilizando amostras de pacientes submetidos ao tratamento com períodos de 1,2 e 5 anos e observaram uma redução relevante desses títulos ao longo dos anos. Sugerindo que, para os resultados obtidos no presente trabalho em relação ao critério de cura, para um período de 5 meses ainda não é possível observar diferenças significativas entre os títulos do paciente antes e depois de iniciar o tratamento. Sendo necessário um período maior do tratamento para início da redução significativa dos títulos.

Figura 2 - Avaliação da aplicabilidade do o anticorpo IgG na avaliação de pacientes após o tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora pelo programa MedCalc Statistical. **Nota:** Avaliação da aplicabilidade do isotipo IgG para o ensaio de citometria de fluxo. AT = Antes do tratamento; PT= após o tratamento; 5m = 5 meses.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou o uso imunoglobulina G através da citometria de fluxo como uma abordagem possível de ser empregada para o diagnóstico da LTA, uma vez que o teste se mostrou positivo para pacientes com a forma ativa da doença, contribuindo para o diagnóstico com uma técnica sensível. Em contrapartida, os resultados obtidos para determinação do critério de cura, comparando soros de pacientes antes e 5 meses após o tratamento, não demonstraram diferença significativa entre os títulos mesmo o teste já consiga identificar como negativo uma pequena porcentagem dos pacientes em tratamento. Assim, esses resultados sugerem que é necessário um intervalo maior de tempo no tratamento desses pacientes para que seja possível observar uma redução significativa dos títulos e assim determinar o critério de cura por citometria de fluxo, permanecendo como perspectiva a continuação do acompanhamento dos pacientes ao longo do tratamento.

REFERÊNCIAS

AMATO, V. S. D, *et al.*. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 40, n. 1, p. 23-30, Jan/Fev 1998.

ARONSON, Naomi *et al.* Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical infectious diseases*, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 2016.

BACELLAR, Olívia *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity*, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.

BRANDÃO-FILHO, Sinval P. *et al.* American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in "Zona da Mata" region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, n. 3, p. 445-449, 1994.

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

BRITO, M. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 2, p. 203-206, 2001.

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

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. *J Immunol Methods*, v. 387, n. 1-2, p. 245- 53, Jan 31 2013.

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

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

FERREIRA, Cassio Porto et al. Descrição de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes com esporotricose e leishmaniose tegumentar americana, com ênfase em mulheres grávidas. 2018. Tese de Doutorado.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 89, n. 5, p. 701-709, 2014.

GOTO, Hiro; *et al.* Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GUTIERREZ, Y. et al. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 45, n. 3, p. 281-289, 1991.

KEENEY, M.; HEDLEY, B. D.; CHIN- YEE, I. H. Flow cytometry—recognizing unusual populations in leukemia and lymphoma diagnosis. *International journal of laboratory hematology*, v. 39, p. 86-92, 2017.

MARTINS-FILHO, O. A. et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 2, n. 5, p. 569-573, 1995.

MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *Journal of Infectious Diseases*, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, 2004.

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

NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. Atheneu, 2002. ISBN 8573792434.

PEDRAL- SAMPAIO G., et al. Detection of IgG Anti-*Leishmania* Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. *PloS one*, , 2016.

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

PEREIRA, V. R. et al. Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 74, n. 3, p. 292-8, Nov 2012.

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

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

RODRIGUEZ, V.; CENTENO, M.; ULRICH, M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell mediated immune response. *Parasite immunology*, v. 18, n. 7, p. 341-345, 1996.

ROMERO, G. A. S. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta tropica*, v. 93, n. 1, p. 49-56, 2005.

SAVOIA, Dianella. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 9, n. 06, p. 588-596, 2015.

SOUZA, M. A. D. et al. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 38, n. 2, p. 137-41, 2005.

SOUZA, S. et al. Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 8, p. e2371, 2013

TIUMAN, Tatiana S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 15, n. 8, p. e525-e532, 2011.

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

ANEXO A - PARECER COMITÊ DE ÉTICA



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO
DE PESQUISAS AGGEU
MAGALHÃES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação e implementação da citometria de fluxo para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana utilizando antígenos recombinantes de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Pesquisador: Valéria Pereira Hernandez

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 73699817.0.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.566.832

Apresentação do Projeto:

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença negligenciada que consiste num sério problema de saúde pública no Brasil, sendo a *Leishmania (Viannia) braziliensis* a principal espécie responsável por essa infecção. Mesmo com o grande avanço tecnológico, atualmente o diagnóstico laboratorial da LTA ainda é considerado laborioso. Os exames parasitológicos, considerados métodos de referência, são métodos invasivos e em geral apresentam baixa sensibilidade. Os métodos moleculares, embora com alta sensibilidade, especificidade, apresentam faixa de detecção limitada para alguns ensaios. Os exames sorológicos podem apresentar reações cruzadas com outras doenças e não permitem a distinção entre infecção ativa ou passada. Diante disto, novas abordagens vêm sendo investigadas e a citometria de fluxo (CF) mostra-se uma tecnologia promissora para o diagnóstico sorológico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Validar e implementar um método para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) através da citometria de fluxo, utilizando antígenos recombinantes de *L.(V.) braziliensis*.

Objetivo Secundário:

Identificar potenciais alvos imunogênicos através de análises in silico; Otimizar as condições de

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.566.832

expressão e purificação das proteínas pré-selecionadas após as suas clonagens em vetores procarióticos; Otimizar as condições para ligação das proteínas selecionadas às esferas de poliestireno para a citometria de fluxo; Detectar e quantificar, por meio da citometria de fluxo, anticorpos anti-L.(V.) braziliensis em pacientes acometidos por LTA; Comparar as técnicas de imunofluorescência indireta, ELISA e citometria de fluxo na avaliação laboratorial dos pacientes; Avaliar o desempenho e aplicabilidade da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial com outras doenças não leishmanióticas, como doença de Chagas, leishmaniose visceral e psoríase; Comparar o desempenho e aplicabilidade da citometria de fluxo no diagnóstico dos pacientes acometidos por LTA, utilizando diferentes preparações antigênicas de Leishmania (V.) braziliensis; Implementar a citometria de fluxo no Serviço de Referência do Instituto Aggeu Magalhães.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco referido é o procedimento de coleta de sangue, considerado um método invasivo, que pode causar desconforto ao indivíduo no local da punção, na hora da picada, e/ou hematoma.

Benefícios:

Contribuir com o programa epidemiológico e profilático existente no Brasil para o controle da LTA. Essa contribuição será dada através de um diagnóstico sorológico rápido, eficaz, seguro, de elevada sensibilidade e elevada especificidade; consequentemente, contribuir no controle da infecção humana, permitindo antecipar ou diminuir as complicações do tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa possui relevância científica, clareza na descrição do método e está compatível com sua execução.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta todas as documentações e demais declarações exigidas pelo Sistema CEP/CONEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O referido projeto, nesta versão, apresentam todas as informações necessárias para compreensão do estudo, assim como todas as documentações exigidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.566.832

condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_980618.pdf	28/12/2017 13:39:44		Aceito
Outros	carta_resposta_pendencias_dezembro_2017_valeria.doc	28/12/2017 13:38:56	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_Ausencia_atualizada_dezembro_2017.doc	28/12/2017 13:38:16	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PereiraV_atualizado_2017_final.doc	28/12/2017 13:35:31	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	valeriapereira_projeto_pendencia_atualizado_dezembro_2017.doc	28/12/2017 13:35:12	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	compromisso_valeriapereira.pdf	17/08/2017 13:49:53	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	declaracao_biorrepositorio_srl_2017.pdf	17/08/2017 13:49:37	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Outros	declaracao_biorrepositorio_valeria.pdf	17/08/2017 13:49:11	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	assinaturas_participantes_final.pdf	17/08/2017 13:48:15	Valéria Pereira Hernandes	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_assinada.pdf	17/08/2017 13:45:11	Valéria Pereira Hernandes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



**FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO
DE PESQUISAS AGGEU
MAGALHÃES**



Continuação do Parecer: 2.566.832

RECIFE, 27 de Março de 2018

Assinado por:
Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br