

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE:  
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

**RAQUEL SOARES BANDEIRA CÂMARA**

**ANÁLISE PRELIMINAR DE ANTÍGENO RECOMBINANTE E  
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS APLICADOS NO DIAGNÓSTICO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR UTILIZANDO URINA  
DOS PACIENTES**

**BELO HORIZONTE**

**2024**

Raquel Soares Bandeira Câmara

**ANÁLISE PRELIMINAR DE ANTÍGENO RECOMBINANTE E  
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS APLICADOS NO DIAGNÓSTICO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR UTILIZANDO URINA  
DOS PACIENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadores:**

Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

**Coorientadora:**

Dra. Fernanda Ludolf Ribeiro

**Belo Horizonte**

**2024**

Câmara, Raquel Soares Bandeira.  
C172a Análise preliminar de Antígeno Recombinante e Peptídeos Sintéticos aplicados no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar utilizando Urina dos pacientes [recurso eletrônico]. / Raquel Soares Bandeira Câmara. - - Belo Horizonte: 2024.  
94f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antônio Ferraz Coelho.  
Coorientador (a): Fernanda Ludolf.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Testes Imunológicos. 3. Urina. 4. Proteínas Recombinantes. 5. Peptídeos. 6. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. II. Ludolf, Fernanda. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WR 350

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL  
**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Às **14:00** horas do dia 05 de fevereiro de 2024, no Canal do CETES - Plataforma LIFESIZE, realizou-se a sessão pública para a 443ª defesa de dissertação de **RAQUEL SOARES BANDEIRA CÂMARA**, número de registro 2022662940, graduada no curso de ENFERMAGEM, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor **EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG)**, **DRA. FERNANDA LUDOLF RIBEIRO DE MELO - COORIENTADORA (UFMG)**, **PROF. MARIO DA SILVA GIUSTA (UNA-BH)**, **PROFA. NATHÁLIA CORAL GALVANI (UFSC)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Análise preliminar de antígeno recombinante e peptídeos sintéticos aplicados no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar utilizando urina dos pacientes**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA**. Conforme arts. 76 e 77 das Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG, as defesas de dissertação e tese são públicas. A aluna e os membros da banca estão cientes e autorizaram a gravação desta defesa, que ficará disponibilizada em acervo da Universidade. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 05 de fevereiro de 2024.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA LUDOLF RIBEIRO DE MELO, Usuário Externo**, em 05/02/2024, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nathalia Coral Galvani, Usuária Externa**, em 05/02/2024, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mário da Silva Giusta, Usuário Externo**, em 05/02/2024, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 06/02/2024, às 09:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3002526** e o código CRC **094E467D**.

---

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

REITORA: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Isabela Almeida Pordeus

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Fernando Marcos dos Reis

### **FACULDADE DE MEDICINA**

DIRETORA: Profa. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

VICE-DIRETORA: Profa. Dra. Cristina Gonçalves Alvim

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Ana Cristina Simões e Silva

SUBCOORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

### **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

VICE-COORDENADOR: Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

#### **MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO**

Prof. Dr. Daniel Vitor Vasconcelos Santos

Profa. Dra. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Parreiras Martins

Profa. Dra. Mariana Costa Duarte

Prof. Dr. Walderez Ornelas Dutra

Representante discente: Raquel Soares Bandeira Câmara

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

## **COLABORADORES**

Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila <sup>1</sup>

Prof. Dra. Denise Utsch Gonçalves <sup>2, 3</sup>

Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal <sup>4</sup>

Marcela Tavares Caldas Eller <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia aplicado ao Desenvolvimento de Novos Fármacos, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup> Hospital São Geraldo, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup> Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>5</sup> Policlínica Municipal Doutor Roberto Shuffner, Teófilo Otoni, Minas Gerais, Brasil.

## **APOIO FINANCEIRO**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

*Dedico esta dissertação a Deus, a quem agradeço por inspirar o desejo em meu coração de trilhar o caminho da ciência, buscando contribuir para o progresso da sociedade. Dedico às pessoas afetadas por esta doença que anseiam por avanços no diagnóstico e por procedimentos que considerem respeitosamente suas limitações.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, cuja mão bondosa tem cuidado de mim e renovado minhas forças e ânimo ao longo deste percurso acadêmico. Agradeço, pois, Ele tem me capacitado diariamente para exercer minhas atividades e alcançar meus objetivos. A Ti toda honra e glória!

Ao meu marido, Ivan, por caminhar ao meu lado nos dias bons e maus, me incentivar e se alegrar com todas as minhas conquistas;

À minha mãe, Léia, pelo amor, cuidado e suporte incondicionais tão necessários para prosseguir nesta jornada e por ser meu exemplo de mulher virtuosa e guerreira;

Ao meu pai, Aladiah, por reconhecer meus talentos e pelo incentivo a prosseguir na área acadêmica;

Ao meu irmão, Samuel, pela parceria, força, admiração e valorização do meu trabalho;

À minha melhor amiga, Sophia, pelo suporte emocional e espiritual, cuidado e apoio para além da academia;

Aos meus amados irmãos em Cristo, pelas constantes orações, amparo espiritual, momentos de desabafo e pelas alegrias dos nossos momentos de comunhão;

Às minhas queridas amigas, Mari Santos, Nicole, Mari Queiróz e Gisele por reconhecer minhas qualidades e competências acadêmicas, pelo apoio, cuidado, compartilhar de alegrias e pelos encontros leves e necessários para a saúde mental mútua;

Ao meu orientador, Professor Eduardo Coelho, que me acolheu desde a iniciação científica. Agradeço pelas valiosas orientações e conselhos na pesquisa, pelo constante incentivo a progredir na área, pela confiança depositada em meu trabalho e pelas oportunidades proporcionadas ao longo desses cinco anos;

À minha coorientadora, Professora Fernanda Ludolf, por acreditar na minha capacidade e me inspirar. Agradeço pelas discussões enriquecedoras, incentivos constantes nos estudos e em capacitações técnicas, pelas necessárias chamadas de atenção e preciosos aconselhamentos;

Aos laboratórios LIMT-Medicina e LBAEL-COLTEC pela generosidade em me receber mesmo sendo inicialmente inexperiente. Agradeço a paciência demonstrada durante meu aprendizado técnico e teórico, essenciais para o desenvolvimento de minhas habilidades como pesquisadora. Às incríveis amizades e parcerias que trilharam este caminho comigo e o tornaram mais leve: Fer Fonseca, Amanda, Grasi, Isabela, Dani Pagliara, Tauane, Dani Vale, Camila, Vivian, Marcelo, Marcela, Fabiana, Breno e a todos aqueles que participaram da minha jornada durante a IC e ao início do mestrado;

Às instituições e ao pessoal que contribuíram com expertise e insumos para este trabalho, representados nas pessoas de: Professor Ricardo Machado (UNESC), Professora Denise Utsch (Ambulatório São Geraldo – HC), Dra. Vanessa Pascoal e à dermatologista Marcela Tavares (Instituto René Rachou). A colaboração desses profissionais, juntamente com suas equipes, foi fundamental para a realização deste trabalho;

Aos pacientes e voluntários da pesquisa, por se colocarem a disposição e por contribuir com os avanços científicos e a formação de novos pesquisadores;

Aos professores parceiros de projetos, docentes e colegiado da Pós-Graduação, pelos ensinamentos e compartilhamento de experiências, e pela contribuição na minha formação como mestre;

À Luciene, secretária do programa, pela disponibilidade e prontidão em prestar auxílio para os discentes;

Ao PPG-IMT pela oportunidade de fazer parte ativamente de uma Pós-Graduação tão reconhecida nacionalmente e ao CAPES que permitiu ser bolsista e financiou este projeto junto à FAPEMIG;

À UFMG pelos reconhecimentos e premiações e, principalmente, por me oferecer grandes oportunidades profissionais e acadêmicas desde a graduação em Enfermagem.

*“Porque dEle, e por meio dEle, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!”.*

(Romanos 11:36)

## RESUMO

As leishmanioses são doenças endêmicas que acometem cerca de um bilhão de pessoas em mais de 90 países no mundo. A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma mais comum e exibe ampla variabilidade clínica, impactando a saúde e qualidade de vida dos pacientes de maneira significativa. O diagnóstico precoce é essencial para o tratamento eficaz e prevenção de casos graves. Entretanto, o diagnóstico parasitológico convencional ou molecular tem coleta invasiva de amostras biológicas, apresenta sensibilidade e especificidade variáveis e/ou possui custo elevado. Ensaios imunoenzimáticos são alternativas, ainda que existam problemas relacionados a sensibilidade dos testes e a necessidade da coleta de sangue considerada invasiva. Nesse sentido, a identificação de novos antígenos para serem usados na melhoria do diagnóstico da LT seria atraente, bem como o uso de amostras biológicas coletadas de forma não-invasiva. Desta forma, no presente trabalho, a proteína fator de iniciação eucariótico 5a (eIF5A), previamente identificada por imunoproteômica em *Leishmania braziliensis*, bem como seu epítipo específico de linfócitos B predito por bioinformática, foram testados para o diagnóstico da LT utilizando urina dos pacientes em comparação ao uso de soro. A técnica de ELISA indireta foi realizada com a proteína recombinante, seu peptídeo e o extrato antigênico solúvel dos parasitos (SLA). O uso da urina apresentou melhores valores de sensibilidade e especificidade quando comparado ao uso do soro, apresentando valores de sensibilidade de 100%, 76,2% e 95,56%, e especificidade de 100%, 86,7% e 100% para a proteína reIF5A, peptídeo sintético e SLA, respectivamente. Enquanto o uso do soro demonstrou valores de 79,07%, 76,19% e 77,27% de sensibilidade, e especificidade de 100%, 88,89% e 95,35% respectivamente para a proteína, peptídeo e SLA. A proteína recombinante mostrou melhores valores em comparação aos demais antígenos, e a ELISA baseada em urina apresentou valores ligeiramente superiores ao uso do soro. Desta forma, o presente estudo fornece dados preliminares da possibilidade de uso da proteína reIF5A e urina para o diagnóstico da LT.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar; diagnóstico; urina; soro; proteína recombinante; peptídeo sintético; sensibilidade, especificidade.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are endemic diseases that affect approximately one billion people in over 90 countries worldwide. Tegumentary leishmaniasis (TL) is the most common form and exhibits wide clinical variability, significantly impacting the health and quality of life of patients. Early diagnosis is essential for effective treatment and prevention of severe cases. However, conventional parasitological or molecular diagnosis involves invasive collection of biological samples, has variable sensitivity, and/or is costly. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are alternatives, although issues related to test sensitivity and the need for invasive blood collection exist. In this regard, the identification of new antigens for improving TL diagnosis would be attractive, as well as the use of non-invasively collected biological samples. In this study, the eukaryotic initiation factor 5a (eIF5A) protein, previously identified by immunoproteomics in *Leishmania braziliensis*, along with its B-cell-specific epitope predicted by bioinformatics, were tested for TL diagnosis using patient urine compared to serum. Indirect was performed with the recombinant protein, its peptide, and the soluble antigenic extract of parasites (SLA). The use of urine showed better sensitivity and specificity values compared to serum, with sensitivity values of 100%, 76.2%, and 95.56%, and specificity of 100%, 86.7%, and 100% for the reIF5A protein, synthetic peptide, and SLA, respectively. In contrast, the use of serum demonstrated sensitivity values of 79.07%, 76.19%, and 77.27%, and specificity of 100%, 88.89%, and 95.35% for the protein, peptide, and SLA, respectively. The recombinant protein showed better values compared to other antigens, and the urine-based ELISA had slightly higher values than serum usage. Thus, this study provides preliminary data on the possibility of using reIF5A protein and urine for the diagnosis of LT.

**Keywords:** Tegumentary Leishmaniasis; diagnosis; urine; serum; recombinant protein; synthetic peptide; sensitivity, specificity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Status mundial de endemicidade da leishmaniose cutânea, 2022.....	28
<b>Figura 2</b> - Número de casos notificados de leishmaniose cutânea, Região das Américas, 2001-2021 .....	29
<b>Figura 3</b> - Casos de leishmaniose tegumentar por UF de infecção, Brasil, 2022 .....	30
<b>Figura 4</b> - Casos confirmados por Forma Clínica segundo Macrorregião de Saúde de notificação - Minas Gerais, 2022.....	30
<b>Figura 5</b> - Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil - 2005.....	31
<b>Figura 6</b> - <i>Leishmania</i> promastigota livres (A); <i>Leishmania</i> amastigota, indicada por setas pretas no citoplasma de macrófagos (B). .....	33
<b>Figura 7</b> - Morfologia simplificada das formas promastigota (A) e amastigota (B) de <i>Leishmania</i> spp. ....	33
<b>Figura 8</b> - Ciclo biológico das <i>Leishmania</i> spp. ....	34
<b>Figura 9</b> - Estrutura em 3D da proteína Fator de Iniciação Eucariótica 5a de <i>Leishmania Braziliensis</i> .....	64
<b>Figura 10</b> - Alinhamento da região de interesse da proteína eIF5A da <i>L. braziliensis</i> com diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .....	64
<b>Figura 11</b> - Avaliação da reatividade do ELISA com os antígenos relF5A, peptídeo e SLA de <i>Leishmania braziliensis</i> usando um painel sorológico humano. ....	65
<b>Figura 12</b> - Avaliação da reatividade do ELISA com os antígenos relF5A, peptídeo e SLA de <i>Leishmania braziliensis</i> usando um painel de urinas humanas. ....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Potencial diagnóstico dos antígenos para o sorodiagnóstico da leishmaniose tegumentar .....	66
<b>Tabela 2</b> - Potencial diagnóstico dos antígenos para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar utilizando urina humana. ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

µL - Microlitro

AUC - Acurácia

BCR - Receptor Específico de Célula B

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa

COVID-19 - *Corona Virus Disease 2019*

CPPI - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

DAT - Teste de Aglutinação Direta

DCM – Diclorometano

DMF – Dimetilforamida

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas

*E. coli* – *Escherichia coli*

eIF5A - Proteína Fator de Iniciação Eucariótico 5a

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

Es - Especificidade

*Fmoc-synthesis* - *Fluorenylmethyloxycarbonyl solid-phase peptide synthesis*

FPLC - Cromatografia Líquida de Proteínas Rápida

G - Giros

HC - Hospital das Clínicas

IC - Intervalo de confiança

IDRM - Intradermorreação de Montenegro

IgA - Imunoglobulina A

IgD - Imunoglobulina D

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IPTG - Isopropil β-D-Tiogalactopiranosídeo

kDa - kiloDaltons

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (Continuação)

kDNA - DNA do cinetoplasto  
LC - Leishmaniose cutânea  
LCD - Leishmaniose cutâneo-difusa  
LIT - *Liver Infusion Tryptose*  
LM - Leishmaniose Mucosa  
LMC - Leishmaniose Mucocutânea  
LT - Leishmaniose Tegumentar  
LV - Leishmaniose Visceral  
MET - Metanol  
MHz - Megahertz  
Min - Minutos  
mL - Mililitro  
mM - Milimolar  
n - número  
NaN<sub>3</sub> - Azida sódica  
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*  
nm - Nanômetro  
NNN - *Novy-MacNeal-Nicolle*  
OD – *Optical Density*  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde  
PBS - *Phosphate-buffered saline*  
PBS-T - *Phosphate-buffered saline added Tween 20*  
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase  
pH - potencial Hidrogeniônico  
pI - Ponto isoelétrico  
PM - Peso molecular  
POC - *Point-of-care*  
PPGIMT - pelo Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical  
qPCR - PCR quantitativa  
rDNA - DNA ribossômico

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (Continuação)

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA - Ácido ribonucleico

ROC - *Receiver Operating Characteristic*

s - Segundos

SARS-CoV-2 - *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

Se - Sensibilidade

SFM - Sistema Fagocitário Mononuclear

SisLeish - Sistema Regional de Informações sobre Leishmanioses

SLA - Antígeno Solúvel de Leishmania

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TES - trietilsilano

TFA - Ácido trifluoracético

TL - *Tegumentary leishmaniasis*

TMB - 3,3',5,5';tetrametilbenzidina linear

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense

# SUMÁRIO

<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	20
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	28
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR .....	28
2.2 ETIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR .....	31
2.3 CICLO BIOLÓGICO DAS <i>Leishmania</i> spp. ....	32
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR .....	35
2.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA.....	37
<b>2.5.1 Diagnóstico Parasitológico</b> .....	38
<b>2.5.2 Diagnóstico Molecular</b> .....	39
<b>2.5.3 Diagnóstico Imunológico</b> .....	40
2.6 AMOSTRAS BIOLÓGICAS NÃO INVASIVAS.....	42
<b>2.6.1 Urina na detecção de imunoglobulinas</b> .....	43
<b>2.6.2 Urina na imunodeteção das Leishmanioses</b> .....	45
2.7 IMUNOPROTEÔMICA APLICADA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR .....	48
<b>2.7.1 Identificação de epítomos específicos de células B aplicada a LT</b> .....	49
2.8 ANTÍGENO eIF5A .....	51
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	54
3.1 OBJETIVO GERAL .....	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	54
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	56
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	56
4.2 AMOSTRAS .....	56
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	57
4.4 PREPARO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE <i>Leishmania braziliensis</i> .....	57
4.5 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	58
4.6 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS ESPECÍFICOS DE CÉLULAS B.....	59
4.7 SÍNTESE DO PEPTÍDEO SELECIONADO.....	59
4.8 ELISA .....	60
<b>4.8.1 ELISA baseada em urina</b> .....	60
<b>4.8.2 ELISA baseada em soro</b> .....	61

## SUMÁRIO

(Continuação)

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	61
<b>5 RESULTADOS</b> .....	64
5.1 IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS ESPECÍFICOS DE CÉLULAS B NA PROTEINA eIF5A .....	64
5.2 POTENCIAL DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS reIF5A, PEPTÍDEO SINTÉTICO E SLA DE <i>L. braziliensis</i> UTILIZANDO SORO.....	65
5.3 POTENCIAL DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS reIF5A, PEPTÍDEO SINTÉTICO E SLA DE <i>L. braziliensis</i> UTILIZANDO URINA .....	66
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	70
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	76
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	78
<b>9 PERSPECTIVAS</b> .....	80
<b>10 REFERÊNCIAS</b> .....	82

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Esta dissertação é requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, concedido pelo Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical (PPGIMT) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O trabalho se insere na linha de pesquisa intitulada "Clínica, Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Tropicais". A linha de pesquisa em foco dedica-se à análise de biomarcadores diagnósticos, bem como à avaliação crítica dos protocolos terapêuticos e do acompanhamento de pacientes afetados por doenças infecciosas e tropicais. O presente trabalho representa uma contribuição para o aprimoramento do diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar, alinhando-se aos objetivos e padrões de excelência do referido programa de pós-graduação.

Em 2021, com o advento da pandemia de SARS-CoV-2, o grupo de pesquisa ao qual a autora está vinculada empenhou-se na busca por um método diagnóstico imunológico não invasivo para a COVID-19. O enfoque foi a utilização de amostras de urina para a detecção de anticorpos IgG específicos, objetivando estabelecer um método de imunodiagnóstico da doença que fosse conveniente para o paciente e eficaz. Os importantes resultados obtidos culminaram em publicações em revistas de elevado impacto, além do alcance de significativa visibilidade midiática e reconhecimento científico internacional. Diante desse contexto, foi proposta a avaliação da metodologia empregada neste estudo para sua aplicação em outras doenças infectocontagiosas, como a leishmaniose tegumentar, visto que não há na literatura científica a aplicação deste método baseado em urina para a detecção da doença.

O grande desafio de Saúde Pública representado pelas leishmanioses e a premente demanda por avanços nas tecnologias diagnósticas para a leishmaniose tegumentar, somados ao desejo de contribuir para a sociedade por meio da ciência, foram determinantes na concepção e execução do presente projeto. O estudo foi realizado em colaboração com o grupo de pesquisa do Professor Ricardo Andrez Machado de Ávila, do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Novos Fármacos da Universidade do Extremo Sul Catarinense, localizado em Criciúma, Santa Catarina.

A parceria com o grupo foi essencial, uma vez que detêm significativo *know-how* em bioinformática, competência crucial para as investigações realizadas neste trabalho. A execução dos ensaios laboratoriais e a análise dos resultados foram conduzidas de forma colaborativa, ocorrendo no Laboratório de Infectologia e Medicina Tropical da UFMG, envolvendo a autora, orientadores e pesquisadores que integram o grupo. A colaboração interinstitucional permitiu a troca de conhecimentos e expertise, fortalecendo as bases para o avanço das pesquisas e evidenciando a importância da interdisciplinaridade para o progresso científico.

Com relação a coleta de amostras, a estreita parceria estabelecida ao longo dos anos com a Dra. Denise Utsch no Hospital São Geraldo – HC/UFMG não apenas facilitou a obtenção de analitos, mas também proporcionou à autora um aprimoramento significativo nas habilidades clínicas necessárias para a avaliação de indivíduos suspeitos de leishmaniose tegumentar humana na região metropolitana de Belo Horizonte e áreas adjacentes. Essa abordagem abrangente envolveu acompanhamento clínico e promoção da educação em saúde para esse público específico. Além disso, a colaboração na coleta de amostras com a Dra. Vanessa Pascoal (Fiocruz Minas) e a dermatologista Marcela Tavares (Teófilo Otoni) desempenhou um papel fundamental na expansão da biblioteca biológica deste trabalho, incorporando amostras de pacientes provenientes de outras regiões endêmicas.

Esta dissertação apresenta resultados preliminares relevantes que podem impactar positivamente na vigilância epidemiológica e na abordagem diagnóstica dessa enfermidade de um modo menos invasivo e cômodo para os pacientes que se submetem a testagem, refletindo um compromisso com a sociedade, melhoria da saúde pública e o progresso científico. Os resultados dos experimentos executados constituem uma parte de um projeto maior em desenvolvimento, que será amplamente explorado ao longo do doutorado da autora.

A autora desta dissertação construiu sua trajetória na área da ciência básica desde 2018, quando iniciou suas atividades no grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Eduardo Coelho, durante a graduação em Enfermagem na UFMG. Sua experiência abrange a participação desde a iniciação científica, envolvendo-se em projetos voltados para o aprimoramento do diagnóstico das leishmanioses tegumentar e visceral e, mais recentemente, COVID-19. Além disso, possui vivência e

competências na execução de pesquisas relacionadas ao tratamento e desenvolvimento de vacinas para leishmanioses.

Ao longo da iniciação científica e do mestrado, desempenhou papel ativo em um projeto de extensão coordenado pela profa. Dra. Denise Utsch, acompanhando pacientes com leishmaniose tegumentar e enfermidades associadas à doença mucosa, no Ambulatório São Geraldo/Hospital das Clínicas/UFMG, onde também realizou a coleta de parte das amostras utilizadas nesta pesquisa. Paralelamente, assumiu a função de monitora em disciplinas ofertadas pelo PPG-IMT e no Colégio Técnico da UFMG. Desde 2022, atua na representação discente do Programa, contribuindo também para a organização de eventos científicos locais e a organização de dados para o Relatório Sucupira na Plataforma CAPES, fortalecendo seu engajamento na comunidade acadêmica. Ademais, a mesma realizou seleção de Doutorado e se apresenta em processo de matrícula junto ao Programa e a UFMG.

***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um complexo de doenças causadas por protozoários, abrangendo mais de 20 espécies patogênicas pertencentes ao gênero *Leishmania* (Cupolillo *et al.*, 2000; WHO, 2023a). Cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para a doença, elevando o risco de infecção diante da exposição. A endemicidade das leishmanioses é notificada em mais de 90 países estando associadas a mudanças ambientais e determinantes sociais de saúde das populações acometidas. As duas principais formas são: a leishmaniose tegumentar (LT), a manifestação mais comum, podendo resultar em desfigurações e afastamento social quando apresenta manifestações severas; enquanto a leishmaniose visceral, é reconhecida como a mais grave por acometer órgãos internos, tornando-se fatal na ausência de tratamento (WHO, 2023a).

Dentre o complexo desta doença, a leishmaniose tegumentar (LT) apresenta o espectro clínico mais abrangente. A forma cutânea, mais prevalente, se caracteriza pela ocorrência de pápulas e nódulos em regiões expostas do corpo, frequentemente evoluindo para a formação de úlceras. Em contraste, a forma mucosa pode se manifestar na mucosa nasofaríngea e oral (Torres-guerrero *et al.*, 2017; BRASIL, 2017). Em ambos os casos, os pacientes acometidos podem se tornar suscetíveis a infecções secundárias diante da vulnerabilidade da barreira epitelial, além de levá-los a estigmatização social devido a formação de cicatrizes extensas em áreas expostas do corpo e deformidades decorrentes da destruição parcial ou total de mucosas (Bailey *et al.*, 2017; WHO, 2018).

O desenvolvimento de testes para o diagnóstico precoce possibilita o tratamento adequado dos casos em tempo hábil, contribuindo assim para a redução das formas graves das leishmanioses (OPAS, 2019; WHO, 2020). Além disso, um diagnóstico eficaz favorece o controle da doença ao permitir levantamentos epidemiológicos, identificação de casos assintomáticos e diagnóstico diferencial, possibilitando o monitoramento dos pacientes, bem como a criação de políticas e estratégias para diagnóstico precoce (Szargiki *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o diagnóstico atual da LT envolve uma combinação de métodos para garantir resultados precisos. O diagnóstico parasitológico requer procedimentos invasivos, como biópsias de lesões, além de exigir a presença do

parasito no material coletado e *expertise* do analisador para identificação destes protozoários que comumente encontram-se em baixa carga nesse tecido. Alternativamente, a detecção de material genético da *Leishmania* spp. por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é possível, mas é um procedimento dispendioso, exigindo equipamentos sofisticados e profissionais treinados (Vega-López, 2003).

Assim, ensaios imunoenzimáticos do tipo *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e testes *point-of-care* (POC) têm sido considerados como métodos a serem aplicados no diagnóstico da leishmaniose tegumentar, podendo apresentar sensibilidade e especificidade maiores quando comparado aos métodos parasitológicos (Duthie; Reed, 2017). Testes sorológicos convencionais empregando parasitos íntegros ou extratos proteicos dos mesmos apresentam boa sensibilidade, embora reações cruzadas possam ocorrer com antígenos de outras doenças. A falta de um antígeno eficaz para diagnosticar a LT, aliada à baixa titulação de anticorpos sorológicos desta doença, compromete a sensibilidade do teste (Kalter, 1994; Cataldo *et al.*, 2010; Goto; Lindoso, 2010). Dada a crescente necessidade de aprimorar os parâmetros nos testes de imunodeteção de anticorpos anti-*leishmania*, a implementação de estratégias inovadoras, como a abordagem imunoproteômica e a bioinformática, oferecem a oportunidade de identificar marcadores antigênicos mais eficazes para o diagnóstico da LT (Ludolf; Ramos; Coelho, 2023). Além desses antígenos reduzirem significativamente as chances de reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos nos testes, o uso de proteínas recombinantes e o desenvolvimento de peptídeos sintéticos derivados de epítopos lineares demonstram vantagens notáveis em termos de custo-benefício, praticidade e aplicabilidade (Noya *et al.*, 2003; Maia; Campino, 2008).

Outra questão está associada ao tipo de amostra biológica empregada nos ensaios imunológicos. Embora o soro seja a escolha mais comum para essa finalidade, a necessidade do uso de agulhas para a coleta sanguínea pode representar uma barreira para indivíduos com fobia do procedimento. Ademais, dificuldades técnicas inerentes à coleta e a exigência de uma infraestrutura laboratorial para o processamento do soro são desafios a serem considerados (Eamudomkarn *et al.*, 2018; Sokolowski *et al.*, 2010). Nesse contexto, a urina emerge como uma amostra não invasiva de aplicabilidade potencial para a detecção

de anticorpos contra a leishmaniose visceral e outras diversas doenças infectocontagiosas (Nagaoka *et al.*, 2021). Adicionalmente, a urina destaca-se por sua fácil coleta e armazenamento, dispensando a necessidade de equipamentos laboratoriais para o processamento, enquanto o manuseio apresenta baixo risco de infecções acidentais (Decramer *et al.*, 2008; Eamudomkarn *et al.*, 2018; Asfaram *et al.*, 2018).

Assim, visando superar as atuais limitações nos métodos de diagnóstico da LT, busca-se uma estratégia alternativa que reúna distintas características, tais como não invasiva, precisa e viável. Dessa forma, no presente estudo, a forma recombinante da proteína Fator de Iniciação Eucariótico 5a (eIF5A) de *Leishmania spp.*, previamente identificada por meio de imunoproteômica (Duarte *et al.*, 2015), e o peptídeo sintético de um de seus epítomos específicos de linfócitos B, aqui identificados por estudos de bioinformática, foram avaliados como antígenos promissores para o diagnóstico imunológico não invasivo da leishmaniose tegumentar, utilizando amostras de urina dos pacientes em ELISA indireta.

***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

As leishmanioses pertencem ao grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), caracterizado por um agrupamento de 20 doenças predominantes nas regiões tropicais que recebem pouca atenção de entidades de saúde e afetam, em sua maioria, comunidades marginalizadas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para a doença, elevando o risco de infecção diante da exposição (PAHO,2016; WHO, 2023a). A endemicidade das leishmanioses é notificada em mais de 90 países estando associadas a mudanças ambientais e determinantes sociais de saúde das populações acometidas (WHO, 2023a).

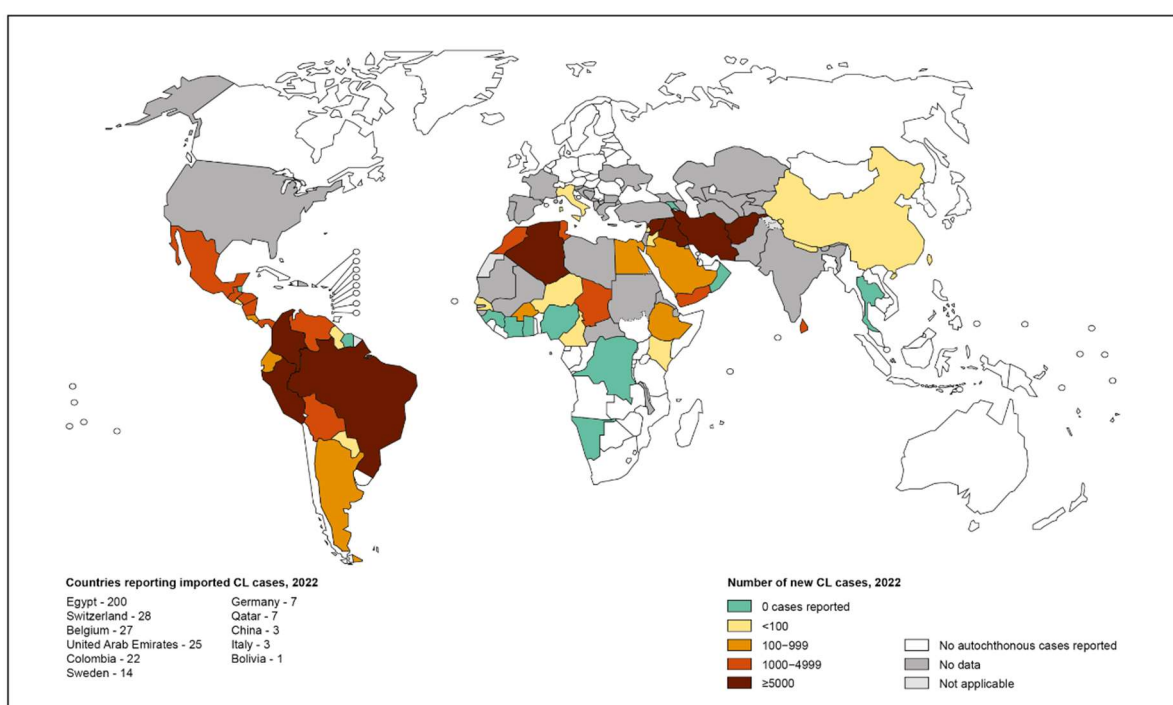


Figura 1 - Status mundial de endemicidade da leishmaniose cutânea, 2022. Adaptado de WHO (2023c).

A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma mais prevalente desta doença, estimando-se 0,7–1 milhão de casos anuais em todo o mundo, entretanto, somente 200.000 casos são reportados para a Sistema Regional de Informações sobre Leishmanioses (SisLeish). Segundo a OMS, 90% destes casos ocorrem no Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Argélia, Irã, Brasil e Peru (Figura 1)

(Burza *et al.*, 2018; WHO, 2023b; WHO 2023c). Nas Américas, o Brasil corresponde a 39% dos casos de LT, seguido por Colômbia e Peru, correspondendo a 15.023 casos dos 37.786 casos relatados em 2021 (Figura 2) (OPAS, 2022).

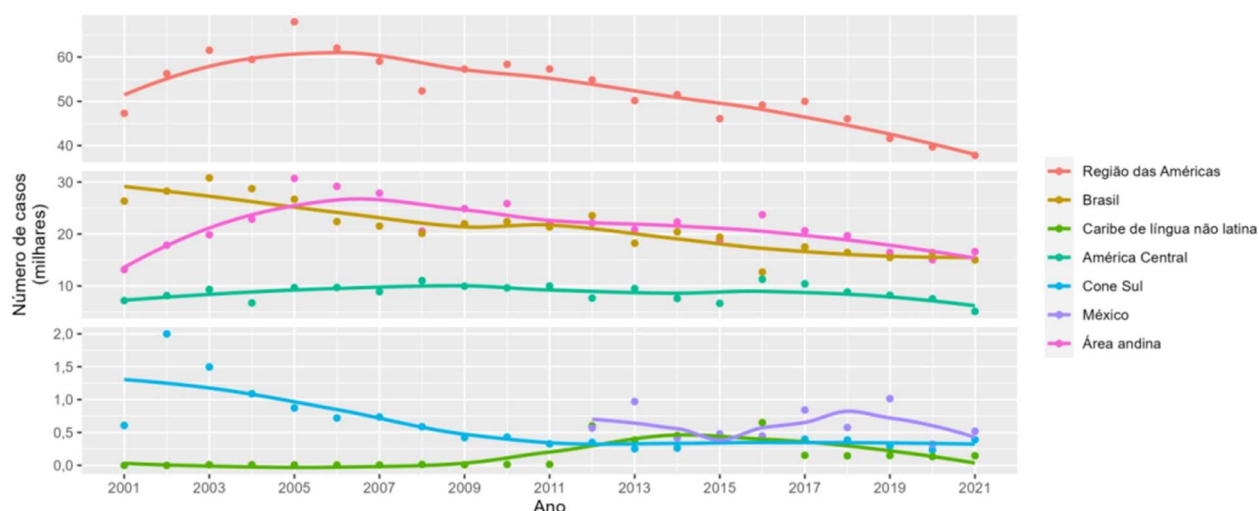


Figura 2 - Número de casos notificados de leishmaniose cutânea, Região das Américas, 2001-2021. Adaptado de OPAS (2022).

No que diz respeito à apresentação clínica da leishmaniose tegumentar nas Américas, entre os 36.662 casos registrados em 2021 que detalharam o tipo manifestação da doença, 92,6% dos acometidos apresentaram a forma cutânea, enquanto 4,5% desenvolveram a forma mucosa ou mucocutânea (LM ou LMC). Os países com as maiores incidências de LM ou LMC incluem o Brasil (756 casos), Peru (419 casos) e Bolívia (281 casos) (OPAS, 2022).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação, em 2022 foram registrados 12.878 casos de LT no Brasil. A região Norte brasileira representa quase metade dos casos (6.019), correspondendo a 46,74% do total, seguido das regiões Nordeste (2.965 casos, 23,02%), Centro-Oeste (1.443 casos; 11,20%), Sudeste (1141 casos; 8,86%) e Sul (117 casos; 0,91%) (Figura 3). Dentre os casos registrados, 1.193 tiveram a Unidade Federativa ignorada. As regiões Sul e Sudeste apresentam os maiores índices de LM entre os casos de LT, sendo de 21,3% e 14,4% dos casos de 2022, respectivamente (BRASIL, 2023a).

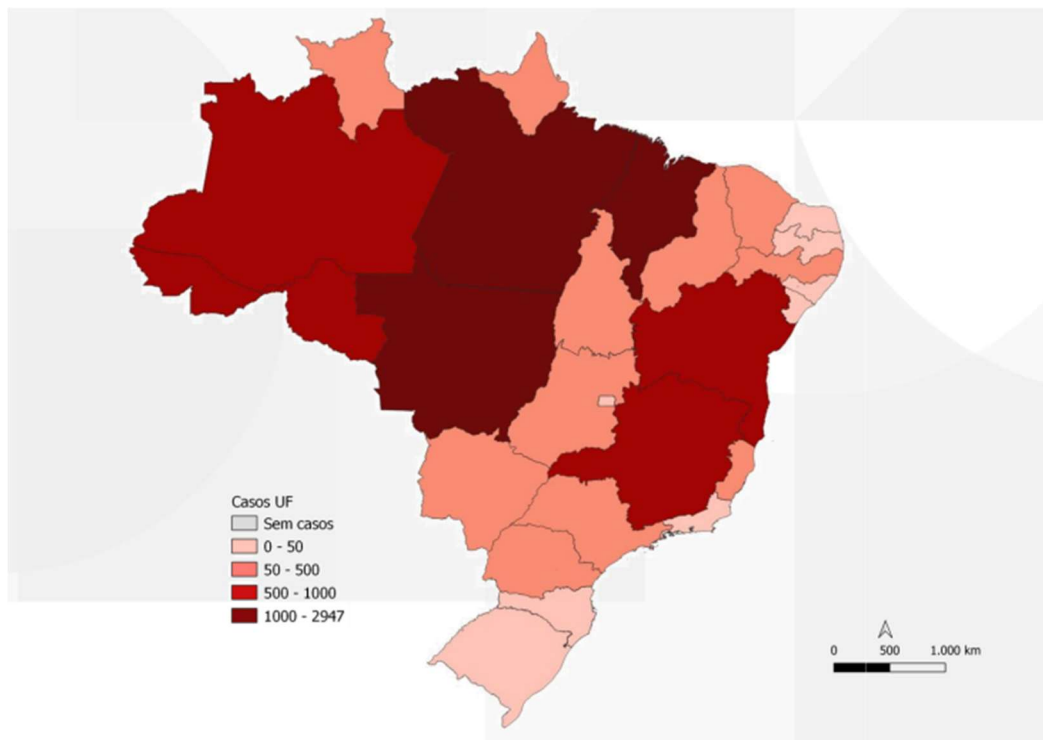


Figura 3 - Casos de leishmaniose tegumentar por UF de infecção, Brasil, 2022. Fonte: BRASIL, 2022

O Estado de Minas Gerais possui o maior número de casos de LT da região Sudeste. Dos 1.142 casos confirmados no estado em 2022, 1.000 correspondem à forma clínica cutânea e 142 à forma mucosa (BRASIL, 2023b). Macrorregião de Saúde Norte apresenta o maior número de casos de LT (401), sendo 306 casos manifestando a forma clínica cutânea e 39 casos com manifestação mucosa (Fig.

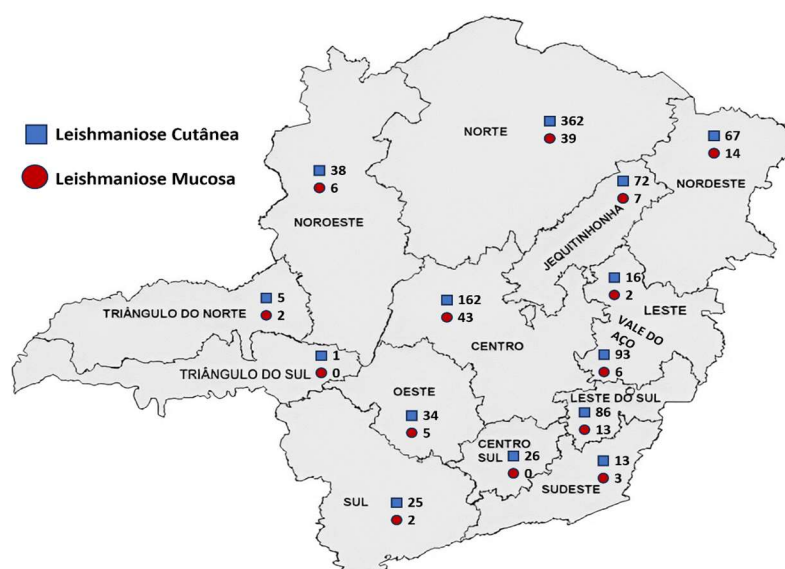


Figura 4 - Casos confirmados por Forma Clínica segundo Macrorregião de Saúde de notificação - Minas Gerais, 2022. Fonte: DataSus

## 2.2 ETIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

As leishmanioses são enfermidades causadas por parasitos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, que compreende cerca de 30 espécies, sendo mais de 20 patogênicas para os seres humanos (Ashford, 2000). Esses parasitos estão classificados no Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae. Essas várias espécies se subdividem em dois subgêneros: *Leishmania*, que completa seu ciclo de desenvolvimento no intestino médio e anterior dos flebotomíneos, e *Viannia*, que passa por uma fase adicional de desenvolvimento no intestino posterior desses insetos (Cupollilo *et al.*, 2000).

No continente americano, foram identificadas 15 espécies de *Leishmania* que apresentam tropismo por diferentes formas da doença, incluindo visceral, cutânea e mucosa (PAHO, 2019). No Brasil, foram identificadas sete espécies dermatrópicas capazes de causar a doença em seres humanos, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (Figura 5). As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, predominante em todas as unidades federativas, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Outras espécies também foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste, tais quais: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* (Alvar *et al.* 2012; BRASIL, 2017).

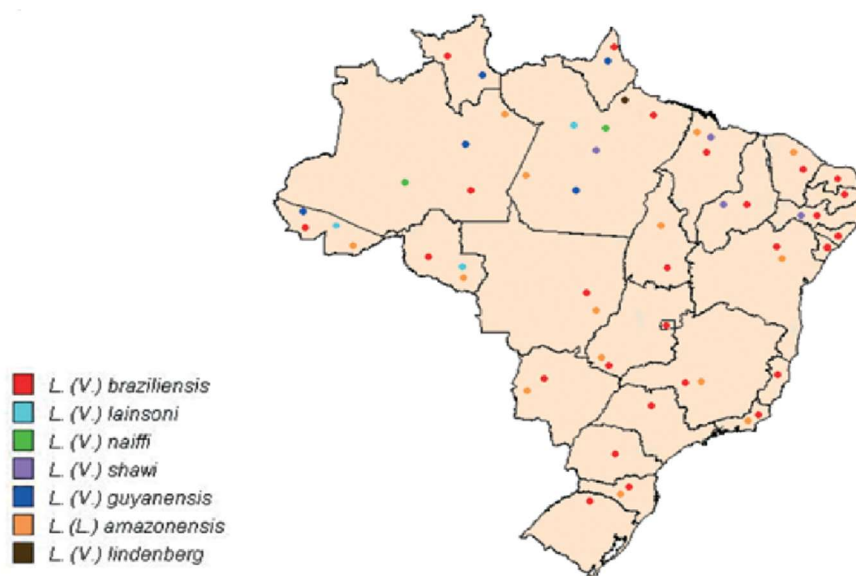


Figura 5 - Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil - 2005. Fonte: BRASIL, 2017.

Os vetores transmissores da LT são denominados flebotomíneos, insetos da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas. Esses pequenos insetos, com cerca de 5mm, podem ser conhecidos popularmente no Brasil como mosquito-palha, tatuquira, birigui, asa branca, entre outros nomes (BRASIL 2017, PAHO, 2019). A transmissão para hospedeiros mamíferos ocorre quando as flebotomíneos fêmeas infectadas pela *Leishmania* dermatrópica realizam o repasto sanguíneo (Grimaldi; Tesh 1993; Bates, 2007).

Os reservatórios desta doença contemplam animais vertebrados que mantêm a circulação do parasito, possibilitando a infecção dos vetores e, assim, assegurando a continuidade do ciclo de transmissão. No Novo Mundo, as leishmanioses são principalmente zoonoses, ou seja, a infecção prevalece em mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos. Não obstante, os humanos desempenham o papel principal como reservatórios quando infectados por algumas espécies de *Leishmania* no Velho Mundo (Desjeux, 1992; PAHO, 2019).

A maioria dos reservatórios são espécies silvestres, entretanto, devido às modificações de seu *habitat* pelo homem, sua adaptação ao ambiente domiciliar e peridomiciliar tem sido comum. Os reservatórios identificados incluem marsupiais, carnívoros, roedores, edentados e primatas. Na área urbana, os canídeos, felídeos e equídeos são as principais fontes de manutenção do parasito (Forattini *et al.*, 1973; Roque; Jansen, 2014). Diante disso, o cenário de desmatamento, associado à construção de estradas, áreas industriais e urbanas em regiões anteriormente arborizadas, contribuem para a formação do ambiente ideal para proliferação dos vetores e sua adaptação a ambientes urbanos e periurbanos, aumentando substancialmente a exposição de animais e humanos ao risco de infecção e perpetuação da transmissão (PAHO, 2016).

### 2.3 CICLO BIOLÓGICO DAS *Leishmania* spp.

A *Leishmania* apresenta duas formas estruturais distintas para realizar seu ciclo de vida: a forma promastigota e a forma amastigota (Figura 6). As promastigotas, podem ser identificadas no intestino do vetor transmissor, sendo considerada a forma infectante da doença. Já as amastigotas, são parasitos

intracelulares obrigatórios que podem ser encontrados no citoplasma de células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, frequentemente em monócitos, macrófagos e células dendríticas da pele (Ashford, 2000; Burchmore; Barrett, 2001; Sacks; Kamhawi, 2001).

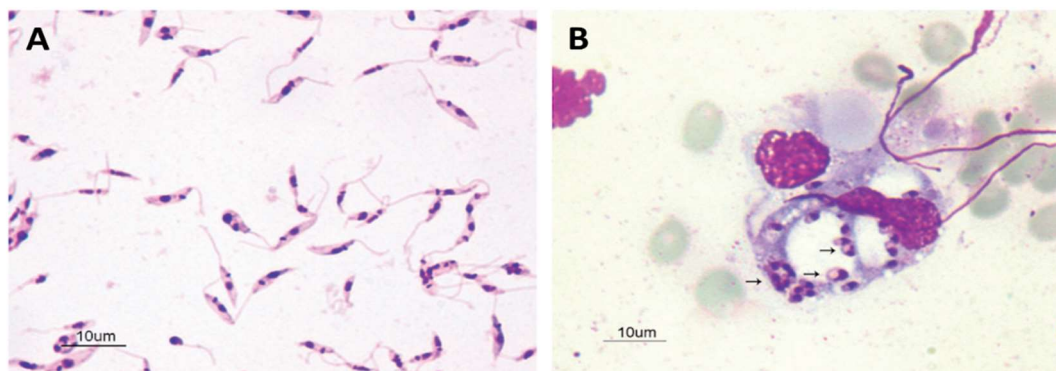


Figura 6 - *Leishmania* promastigotas livres (A); *Leishmania* amastigota, indicada por setas pretas no citoplasma de macrófagos (B). Fonte: PAHO, 2019.

Quanto à morfologia, as promastigotas se caracterizam por sua forma alongada, apresentando um cinetoplasto terminal, região onde concentra-se o DNA mitocondrial, posicionado entre o núcleo central e a porção anterior do protozoário. Além disso, possuem um flagelo que confere mobilidade e habilidade de fixação. Por outro lado, as amastigotas são de forma arredondada ou fusiforme, contendo um núcleo, um cinetoplasto alongado e uma bolsa com rudimentos de um flagelo (Figura 7) (Grimaldi; Tesh, 1993; Ashford, 2000; Sacks; Kamhawi, 2001).

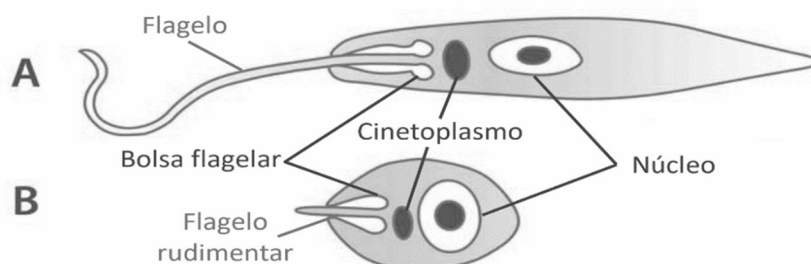


Figura 7 - Morfologia simplificada das formas promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania* spp. Fonte: Adaptado de BATES, 2007.

A multiplicação intracelular da amastigota ocorre por meio de divisão binária em vacúolos parasitóforos (fagolisossomas) induzidos em células do sistema reticuloendotelial do hospedeiro vertebrado. Já no intestino dos flebotomíneos, após

as células infectadas serem ingeridas durante o repasto sanguíneo, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas, a fim de proliferar a sua forma infectante. Portanto, é possível descrever o ciclo biológico deste parasita como heteroxeno, uma vez que se desenvolve alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (Ashford, 2000; Raj *et al.*, 2020; CDC, 2023). Na figura 8 é possível observar o ciclo biológico completo da *Leishmania* sp.

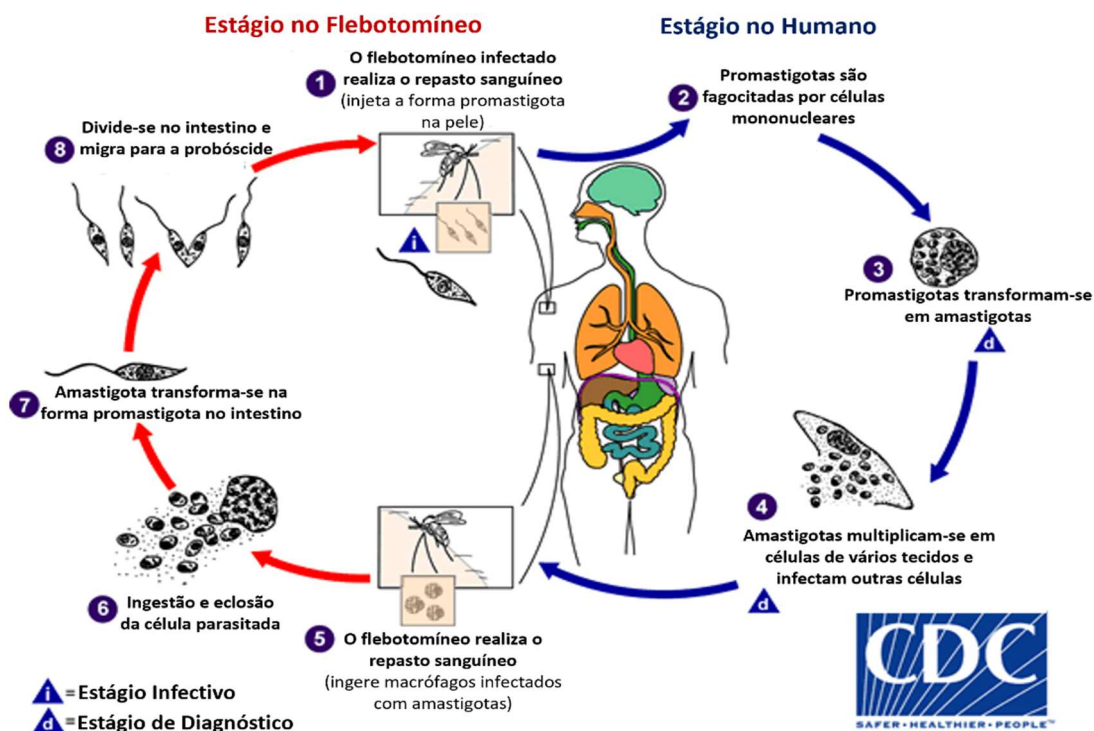


Figura 8. Ciclo biológico das *Leishmania* spp. (1) O ciclo biológico inicia quando a flebotomíneo fêmea infectada, durante a picada, inocula o parasito em seu estágio promastigota metacíclica pela probóscide enquanto realiza o repasto sanguíneo; (2) As formas promastigotas depositadas no local da picada são fagocitadas por células do SFM; (3) Dentro dessas células, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas, que se multiplicam por divisão simples (4); após a lise da célula hospedeira com liberação das amastigotas, outras células do SFM são infectadas; (5) os flebotomíneos, por sua vez, tornam-se infectados quando ingerem essas células infectadas durante o repasto sanguíneo; (6) no sistema digestivo do flebotomíneo, as formas amastigotas serão liberadas das células hospedeiras; (7) as amastigotas diferenciam-se em promastigotas e migram para a probóscide, reiniciando assim o ciclo de transmissão. Fonte: Adaptado de CDC, 2023.

## 2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

As leishmanioses podem apresentar diferentes quadros clínicos que dependem, principalmente, da espécie infectante do parasito e do estado imunológico do hospedeiro infectado (Herwaldt, 1999; Nakamura *et al.*, 2006). Do ponto de vista clínico, e considerando a diversidade e complexidade biológica do parasito, dos vetores e dos hospedeiros vertebrados, a leishmaniose tegumentar é classificada de acordo com o caráter espectral das manifestações clínicas apresentadas, como as formas cutânea (LC), cutâneo-difusa (LCD) e mucosa ou muco-cutânea (LM) (Grimaldi; Tesh, 1993; WHO, 2023a).

A LC é caracterizada pela manifestação de pápulas e nódulos únicos ou múltiplos em áreas expostas do corpo no local da picada do flebotomíneo, as quais podem evoluir progressivamente para úlceras indolores ao longo de 2 semanas a 2 meses. A manifestação mais comum, a forma cutânea localizada, possui tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento. Já a forma disseminada é rara e se caracteriza pela ocorrência de múltiplas lesões papulares que surgem em locais distantes da picada inicial, possivelmente devido à disseminação do parasito através da corrente sanguínea ou do sistema linfático (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; BRASIL, 2017).

As úlceras clássicas, quando não infectadas por patógenos secundários, possuem um formato arredondado, com base eritematosa, bordas bem delimitadas, elevadas ou espessas, com leito de ferida apresentando tecido de granulação de aparência friável ou desvitalizado, com comum formação de crosta sob a lesão (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; PAHO, 2019; BRASIL, 2017). No Brasil, os agentes etiológicos responsáveis pelas distintas manifestações da LC são comumente associados a *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e a *L. guyanensis* (Marzochi; Marzochi, 1994; BRASIL, 2017).

A LCD é uma forma rara e grave da doença que se manifesta em indivíduos com anergia ou com uma deficiência específica na resposta imunológica celular a *Leishmania*, o que impede o hospedeiro de reagir de forma apropriada à infecção. As lesões predominam na forma de nódulos não ulcerados de progressão gradual, com carga parasitária elevada. Essas lesões disseminam-se a partir do ponto inicial da infecção e podem abranger a totalidade do corpo do paciente (Reithinger *et al.*,

2007). Além de baixas chances de cura espontânea, a resposta ao tratamento é geralmente ineficaz, frequentemente também resultando em recidivas. No Brasil, essa variante é causada pela *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; PAHO, 2019; BRASIL, 2017).

A forma clássica de manifestação da LM pode tornar-se consequência secundária a lesões cutâneas causadas por algumas espécies de *Leishmania*, caracterizando-se por lesões destrutivas que afetam parcial ou totalmente as cartilagens e mucosas das vias aéreas superiores, boca e faringe. A destruição tecidual é caracterizada por inflamação intensa, embora a carga parasitária seja baixa. Esse tipo de leishmaniose representa uma complicação resultante da disseminação do *parasito* via hematogênica ou linfática ao longo de meses ou anos a partir de uma lesão cutânea distante. Mais raramente, pode ocorrer por extensão direta das lesões cutâneas para as mucosas da face ou devido à picada direta do vetor na mucosa (PAHO, 2019). É comum que indivíduos acometidos relatem sintomas como obstrução nasal, eliminação de crostas, epistaxe, disfagia, odinofagia, rouquidão, dispneia e tosse. No exame da mucosa, podem ser observados sinais como eritema, infiltração, crostas, pontos sanguinolentos, erosão e ulceração com um fundo granulomatoso (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; BRASIL, 2017).

No Brasil, o parasito mais frequentemente envolvido na LM é a *L. braziliensis*, mas também há casos menos expressivos produzidos por outras espécies, como a *L. guyanensis* (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; PAHO, 2019). A migração de *L. braziliensis* do sítio cutâneo primário da infecção até as mucosas não é bem compreendida devido a mecanismos ainda desconhecidos. Alguns poucos estudos sugerem que a disseminação do parasito para outras regiões do corpo podem estar relacionada à migração de macrófagos infectados após a exposição (Camera *et al.*, 2006; Alves-Ferreira *et al.*, 2015).

Diante dessas manifestações, ainda que apenas 1% dos casos evolua para óbito, os indivíduos acometidos pelo amplo espectro das afecções clínicas da LT podem se tornar suscetíveis a infecções secundárias severas diante da vulnerabilidade da barreira epitelial e mucosa (BRASIL, 2017). Além das implicações biológicas, é essencial considerar os prejuízos nos aspectos psicossociais. A formação de cicatrizes extensas em áreas visíveis do corpo e deformidades

resultantes da destruição parcial ou total da pele e mucosas podem resultar em discriminação, estigmatização e isolamento social desses indivíduos pela sociedade em que estão inseridos, acarretando a eles consequências adversas para sua saúde mental e bem-estar financeiro diante do afastamento ocupacional (Bailey *et al.*, 2017; WHO, 2018).

## 2.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA

Diante deste problema de saúde pública, agências internacionais especializadas em saúde como a OMS e OPAS, têm prestado apoio aos países endêmicos fortalecendo as iniciativas de vigilância e controle de doenças negligenciadas, incluindo o incentivo a ampliação de centros diagnósticos e testagem da população para leishmanioses (OPAS, 2019). O diagnóstico precoce e manejo eficaz podem diminuir a ocorrência de formas graves da doença, prevenindo incapacidades severas e óbitos (Handler *et al.*, 2015).

O diagnóstico diferencial da LT impõe um desafio significativo aos profissionais de saúde. Além da pouca familiaridade de muitos médicos com essa doença, a enfermidade também apresenta a capacidade de mimetizar clinicamente outras doenças infecciosas e uma ampla variedade de condições malignas. As diversas apresentações clínicas da LT, aliadas a uma extensa lista de doenças confundidoras, especialmente condições granulomatosas como paracoccidioidomicose, esporotricose, cromomicose, tuberculose cutânea, e cânceres de pele como carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular, podem tornar o diagnóstico da LT um processo desafiador (Bayle; Lockwood, 2007; Handler *et al.*, 2015; BRASIL, 2017; Tirelli *et al.*, 2017).

Na investigação clínica de suspeita de Leishmaniose Tegumentar, o diagnóstico presuntivo inicial é estabelecido considerando critérios clínico-epidemiológicos. Embora a anamnese médica permita fortemente indicar a possibilidade da doença por meio de achados clínicos (sinais e sintomas), histórico de exposição prévia, confirmação de residência ou viagem a áreas endêmicas, e/ou a presença de picadas de flebotomíneos, o diagnóstico é respaldado apenas pela identificação direta ou indireta do parasito (Handler *et al.*, 2015). Nesse sentido, ainda não há uma ferramenta diagnóstica universal de padrão-ouro para a

leishmaniose tegumentar o que implica a necessidade de utilizar uma combinação de diferentes métodos laboratoriais para obter resultados precisos (Vega-López, 2003; BRASIL, 2017).

### 2.5.1 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico direto é um dos principais e mais clássicos métodos, uma vez que envolve a pesquisa e visualização de amastigotas utilizando microscopia óptica. É realizado por meio do exame de amostras coletadas de forma invasiva por meio de esfregaço, escarificação ou biópsia da borda da lesão com posterior impressão do fragmento cutâneo em uma lâmina por aposição (*imprint*), que são submetidos à coloração de Giemsa (Vega-López, 2003; de VRIES *et al.*, 2015; BRASIL, 2017).

Apesar do baixo custo da técnica, a sensibilidade desse método é limitada, uma vez que requer a análise de um profissional experiente e, frequentemente, os casos de LC apresentam uma carga parasitária bastante reduzida no tecido, dificultando as chances de visualização do parasito. Nesse contexto, há aproximadamente 50-70% de acurácia no Velho Mundo e ainda mais reduzida, cerca de 15-30%, no Novo Mundo, onde casos crônicos e leishmaniose mucocutânea são frequentes (Vega-López, 2003; Goto; Lindoso, 2012).

Além desse método, a análise histopatológica também possibilita a detecção de amastigotas em amostras de borda de lesão ativa, as quais são posteriormente parafinadas e coradas com hematoxilina-eosina para visualização. A sensibilidade pode variar de 30% a 60%, dependendo de fatores como o tempo de evolução, o aspecto macroscópico da lesão, a qualidade da amostra tecidual e o estado imunológico do paciente (Magalhães, et al. 1986; Vega-López, 2003).

Além deste método, também é possível cultivar amostras de biópsia e aspirado de lesão em meio *Novy-MacNeal-Nicolle* (NNN), meio *Liver Infusion Triptose* (LIT) ou meio Schneider. Todavia, a capacidade de crescimento da promastigota em cultura é variável, exigindo instalações laboratoriais e controle severo de contaminantes. Ademais, são necessários cerca de uma semana a 10 dias para obter um rendimento satisfatório de promastigotas. Casos crônicos e baixa

carga parasitária diminuem ainda mais a sensibilidade diagnóstica, portanto são raramente utilizados (Faber *et al.* 2003; Vega-López, 2003; BRASIL, 2017).

### 2.5.2 Diagnóstico Molecular

Quanto aos métodos moleculares, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite amplificar o DNA da *Leishmania* presente em biópsias de lesões, oferecendo vantagens como detecção em amostras com baixa carga parasitária, alta sensibilidade e especificidade, além da capacidade de caracterização de gênero e espécie do protozoário (Reithinger *et al.*, 2007; Neitzke-Abreu *et al.*, 2013).

Uma revisão sistemática analisou a acurácia diagnóstica de diferentes técnicas baseadas em PCR, incluindo PCR convencional, PCR em tempo real (real-time PCR), amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP), amplificação por recombinase (RPA) e PCR específica para polimorfismos (PS-PCR) (Mesa *et al.*, 2020). As sensibilidades variaram entre 61% e 100%, enquanto as especificidades oscilaram entre 11% e 100%. A análise agrupada revelou sensibilidade e especificidade elevadas para PCR aplicada a amostras de esfregaço, sendo 0,95 (IC 95%: 0,90–0,98) e 0,91 (IC 95%: 0,70–0,98), respectivamente. Em contraste, amostras mais invasivas, como aspirados, biópsias de pele e *swabs*, apresentaram valores ligeiramente inferiores: sensibilidade de 0,90 (IC 95%: 0,80–0,95) e especificidade de 0,87 (IC 95%: 0,76–0,94). Nos estudos com recrutamento consecutivo, a especificidade foi ainda menor (0,88; IC 95%: 0,59–0,98), com maior variabilidade nos resultados.

No entanto, devido ao maior custo de aplicação em comparação aos métodos parasitológicos tradicionais, bem como à exigência de infraestrutura especializada e pessoal tecnicamente qualificado, o uso da PCR na rotina laboratorial ainda é limitado. Essa limitação é especialmente evidente em regiões endêmicas, onde sua aplicação costuma se restringir a centros de referência localizados em cidades de maior porte. Além disso, a qualidade do material coletado e do processamento da amostra podem interferir significativamente no resultado da PCR (Vega-López, 2003; Goto; Lindoso, 2010; BRASIL, 2017).

Com o objetivo de aprimorar a precisão analítica da PCR convencional, alguns laboratórios têm adotado a técnica de PCR quantitativa em tempo real

(qPCR) para quantificação de DNA do cinetoplasto (kDNA) ou DNA ribossômico (rDNA) da *Leishmania*. Essa abordagem destaca-se pela rapidez na obtenção de resultados, necessidade da presença de pouco material genético na amostra, ampla faixa dinâmica para a quantificação de alvos de DNA e pela redução significativa na contaminação cruzada, devido à eliminação da necessidade de manipular os produtos de PCR para realizar a eletroforese em gel (Sevilha-Santos *et al.*, 2019; Moreira *et al.*, 2018).

A técnica depende da análise do sinal fluorescente produzido durante a amplificação, que pode ser gerado usando corantes fluorescentes intercalados ou sondas fluorescentes. Apesar de seu potencial, a aplicação clínica rotineira ainda é limitada devido ao alto custo associado aos equipamentos e reagentes. Esse desafio financeiro constitui uma barreira significativa, restringindo, assim, a adoção generalizada dessa técnica além do âmbito da pesquisa (Galluzzi *et al.*, 2018).

### 2.5.3 Diagnóstico Imunológico

O imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar baseia-se principalmente na detecção anticorpos anti-*Leishmania*, especialmente do tipo IgG, presentes em amostras de soro por meio de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o *Western Blot* (De BRITO *et al.*, 2020; REIMÃO *et al.*, 2020). Embora sejam métodos pertinentes e economicamente mais acessíveis em comparação ao diagnóstico molecular, sua adoção ainda não é amplamente difundida na prática clínica rotineira da LT, devido à variabilidade na eficácia dessas abordagens. Esta variabilidade é principalmente atribuída à diversidade da resposta humoral do hospedeiro, bem como à escolha do antígeno utilizado para a condução do teste (Goto; Lindoso, 2012; Gomes *et al.* 2014).

Considerando a resposta humoral, a produção de IgG anti-*Leishmania* em pacientes com LC localizada ou em imunossuprimidos pode ser mais fraca, portanto, é comum ser observado baixa titulação de anticorpos e, por consequência, casos de falso-negativos em testes menos sensíveis. Por outro lado, para lesões crônicas associadas às formas mucosas, disseminada e recidiva, a sensibilidade dessas técnicas pode ser significativamente maior devido à alta titulação de anticorpos séricos. Além disso, em áreas endêmicas, é possível a ocorrência de resultados

falso-positivos em populações assintomáticas, o que acrescenta uma camada de complexidade ao processo diagnóstico e evidencia a necessidade de desenvolvimento de melhores antígenos (Kar, 1995; Goto; Lindoso, 2010; Goto; Lindoso, 2012; de Vries, 2015).

Nesse sentido, a eficácia desses métodos está intrinsecamente ligada ao tipo, origem e pureza do antígeno empregado. O uso de antígenos como lisados totais do parasito ou promastigotas inteiras, como o extrato solúvel de *Leishmania* (SLA), podem comprometer a especificidade do diagnóstico, uma vez que compartilham epítomos de reação cruzada com outros microrganismos, particularmente *Trypanosoma* spp., *Mycobacterium* spp., *Plasmodium* spp. e *Schistosoma* spp. (Kar, 1995; Goto; Lindoso, 2010; Aronson *et al.*, 2017). A homologia das sequências proteicas entre as espécies possibilita que os anticorpos desenvolvidos após o contato com um desses parasitos sejam capazes de interagir com proteínas similares provenientes de outra espécie (Cervantes-Landin *et al.*, 2014). Portanto, a incorporação de preparações que envolvam antígenos purificados ou antígenos recombinantes de *Leishmania* para fins de diagnóstico sorológico podem melhorar sua especificidade (de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015; de Vries 2015).

Por fim, é relevante mencionar a utilidade da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) como uma técnica de triagem amplamente reconhecida no diagnóstico imunológico LT. Introduzida por Montenegro em 1926, essa abordagem destacou-se pela sua aplicabilidade clínica favorável e custo acessível, tornando-se uma escolha prática e eficaz no cenário clínico local (Montenegro, 1926; BRASIL, 2017). Neste teste cutâneo, a resposta imune celular é avaliada por meio de endureção da pele 48 a 72 horas após a inoculação de antígeno, sendo considerado um diagnóstico imunológico de hipersensibilidade tardia. O endurecimento dérmico local é avaliado e considerado positivo quando maior que 5 mm (Goto; Lindoso, 2012).

A sensibilidade da IDRM varia de 86,4% a 100% em pacientes que apresentam a forma cutânea. No entanto, em áreas endêmicas, resultados positivos podem ser observados em 20% a 30% dos casos assintomáticos, pode também ser associado a episódios anteriores de leishmaniose ou exposição subclínica ao parasito. Além disso, pacientes com LM frequentemente apresentam reações exacerbadas, caracterizadas por extensa endureção, presença de vesículas no

centro da reação, e a possibilidade de ulceração e necrose local (Antonio *et al.* 2014; Pinheiro *et al.*, 2020, BRASIL, 2017). No Brasil, a produção do antígeno foi descontinuada em 2017, uma vez que o de Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) do Paraná não foi capaz de adequar-se às novas regulações de infraestrutura estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Braz, 2019).

## 2.6. AMOSTRAS BIOLÓGICAS NÃO INVASIVAS

Visando a coleta de amostras biológicas para a detecção de parasitos, antígenos e anticorpos, o diagnóstico das leishmanioses é predominantemente fundamentado na aplicação de métodos invasivos. Dentre esses métodos, destaca-se a utilização de técnicas como punções periféricas, raspagens e biópsias de pele e mucosas para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. No caso da leishmaniose visceral, ainda se incluem aspirados de baço, fígado, medula óssea ou gânglios linfáticos, os quais apresentam risco importante de sangramento, dor e infecções bacterianas e fúngicas secundárias (Taslimi *et al.*, 2017; de Brito *et al.* 2020; Sereno *et al.*, 2020). Dentre esses, a punção periférica é a menos invasiva e amplamente utilizada na área de pesquisa dada a importância do soro e plasma como amostras biológicas essenciais para a busca de anticorpos e novos biomarcadores para o imunodiagnóstico.

Apesar do soro ser a amostra mais convencional para testes imunológicos, sua coleta pode representar um desafio em comunidades remotas ou com acesso restrito à saúde. Isso se deve não apenas à dificuldade de alcance dessas áreas, mas também à escassez de recursos financeiros e infraestrutura. Muitos desses locais deparam-se com limitações na obtenção de equipamentos, na disponibilidade de flebotomistas para a coleta e na presença de profissionais qualificados para o processamento adequado das amostras (Eamudomkarn *et al.*, 2018; CDC, 2022). Além disso, devido a dificuldades técnicas inerentes à coleta e diversas particularidades dos pacientes, o procedimento de coleta sanguínea pode ser uma experiência desconfortável. A fobia de agulhas afeta cerca de 10% da população mundial, sendo ainda mais prevalente em crianças, levantando a recusa de procedimentos diante do medo (Sokolowski *et al.* 2010; McLennon; Rogers, 2018).

Perante a necessidade do desenvolvimento de métodos diagnósticos não invasivos, a utilização de secreções e fluidos corporais emerge como uma perspectiva promissora, viabilizando aplicações clínicas eficazes para diversas doenças e potencialmente integráveis a dispositivos *Point-of-Care* (POC) (Ates *et al.*, 2021). Uma recente revisão sistemática oferece evidências sobre o uso de amostras biológicas não invasivas na detecção e diagnóstico de infecções causadas por parasitos Trypanosomatidae. Ao avaliar a aplicação dessas amostras para diversas formas da leishmaniose humana, destacam-se as possibilidades de identificação da presença de: parasitos em fezes, saliva, humor aquoso, esfregaço conjuntival e urina; material genético de *Leishmania* na saliva, swab oral, secreção nasal e urina; antígenos na saliva e urina; e anticorpos em saliva, escarro e urina (Serenio *et al.*, 2020). Nessa revisão, a urina destaca-se como o fluido corporal mais estudado no diagnóstico de leishmanioses.

Há inúmeras vantagens na utilização de amostras de urina para aplicação em testes diagnósticos e estudos epidemiológicos. Primeiro, em condições normais de saúde, a urina pode ser colhida de modo não invasivo, fácil e em grande volume, sendo atraumático e menos desconfortável para crianças e indivíduos com fobias. Segundo, é de baixo custo de coleta e processamento, não sendo necessário o uso de dispositivos hospitalares complexos, perfurocortantes ou profissionais de saúde especializados. As amostras de urina podem ser colhidas pelos próprios pacientes instruídos, cuidadores, agentes comunitários de saúde e qualquer profissional de saúde utilizando um coletor universal estéril oferecido pelo estabelecimento de saúde ou pela coordenação da pesquisa. Por fim, é de fácil armazenamento, sem necessidade de equipamentos laboratoriais para o processamento, além do manuseio apresentar baixo risco de infecções acidentais (Decramer *et al.*, 2008; Eamudomkarn *et al.*, 2018; Asfaram *et al.*, 2018, Nagaoka *et al.*, 2021).

### **2.6.1. Urina na detecção de imunoglobulinas**

A urina é um fluido gerado pelos rins, resultando em um líquido que contém informações biológicas diretamente derivadas do sangue. Durante esse processo, o glomérulo atua na filtração do plasma, gerando a chamada urina primitiva, enquanto o túbulo renal tem a função de reabsorver a maior parte dessa urina inicial. A urina

resultante é então conduzida dos rins para a bexiga através dos ureteres, onde é armazenada antes de ser eliminada posteriormente (Decramer *et al.*, 2008; Dantzier; 2016; Tasoglu, 2022). O processo de formação da urina oferece um período apropriado para a difusão de metabólitos, sais, proteínas, pigmentos e outros analitos valiosos provenientes dos capilares sanguíneos circundantes. Dessa forma, a urina não apenas reflete informações dos rins e do trato urinário, mas também incorpora dados de órgãos mais distantes, obtidos no plasma por meio da filtração glomerular (Decramer *et al.*, 2008; Sereno *et al.*, 2020; Ates *et al.*, 2021).

A urina de um indivíduo saudável contém uma quantidade significativa de peptídeos e proteínas, sendo uma rica fonte não invasiva de potenciais biomarcadores que ainda estão sendo explorados pela ciência (Decramer *et al.*, 2008; Zhao, *et al.* 2017). As primeiras evidências objetivas da presença de imunoglobulinas na urina foram publicadas em meados da década de 50 por Boyce e colaboradores (1954) e McGarry, junto ao seu grupo de pesquisa (1955). Segundo Hanson e Tan (1965), anticorpos e fragmentos de anticorpos representam uma proporção significativa das proteínas excretadas diariamente na urina.

Posteriormente, diversos autores foram capazes de caracterizar os isotipos de imunoglobulinas presentes na urina humana: Turner e Rowe (1967) – IgG, IgA secretora em indivíduos saudáveis; Bienenstock e Tomasi (1968) – IgG, IgA secretora em indivíduos saudáveis; Burdon (1970; 1971) IgG, IgD, IgA e IgA secretora em indivíduos saudáveis e IgM em pacientes com infecção urinária; Kaufman, Katz e McIntosh (1970) – IgA e IgA secretora em pacientes com infecção urinária; Kuriyama (1979) - IgG, IgM, IgA e IgA secretora indivíduos saudáveis.

As evidências apresentadas pelos estudos pioneiros abriram caminho para um extenso corpo de pesquisas no campo das doenças infecto-contagiosas. Essas investigações têm consistentemente demonstrado a viabilidade do diagnóstico fundamentado na pesquisa de anticorpos na urina. Uma gama de estudos possibilitaram a identificação de anticorpos para as seguintes doenças pelo método ELISA: filariose (Itoh *et al.*, 2001; Samad, 2013), hepatites A e C (Perry *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994; Elsana *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2002, Rodríguez-Lay *et al.*, 2003), esquistossomose (Itoh *et al.*, 2003; Elhag *et al.*, 2011), dengue (Itoh *et al.*, 2003; Vázquez *et al.*, 2007), estrogiloidíase (Eamudomkarn *et al.*, 2018; Chungkanchana *et al.*, 2022; Wongphutorn *et al.*, 2023), infecção por *Helicobacter*

*pylori* (Gong; Li; Yuan, 2017), COVID-19 (Ludolf *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2023a; Ramos, Pereira, Cardoso *et al.*, 2023b), dentre outras doenças (Nagaoka *et al.*, 2021). No caso das leishmanioses, os estudos dedicados à imunodeteção de anticorpos urinários até o momento contemplam somente os casos de leishmaniose visceral humana e canina, destacando-se entre as pesquisas o Teste de Aglutinação Direta (DAT) e ELISA, os quais serão detalhados a seguir.

### 2.6.2. Urina na imunodeteção das Leishmanioses

O DAT é uma técnica laboratorial utilizada para detectar semi-quantitativamente a presença de anticorpos em uma amostra biológica (Mineo, *et al.* 2016). Na Leishmaniose Visceral é feito ao misturar o material em diluições crescentes com antígenos de *L. donovani*. Se a amostra contiver anticorpos correspondentes a antígenos do *parasito*, ocorrerá uma reação de aglutinação, onde as partículas se agrupam e formam aglomerados visíveis. No estudo conduzido por Islam *et al.* (2004) em humanos, foi possível obter resultados expressivos: sensibilidade de 90,7% e especificidade de 96,4% nas amostras de urina, empregando o uso de IgG anti-humano como um anticorpo potencializador da reação. Esses valores equiparam-se aos de ELISA utilizando urina como amostra (93,3% e 97,3%) e do DAT tradicional com soro (91,0% de sensibilidade). Já no estudo de Hatam e colaboradores (2007), a sensibilidade e especificidade do DAT baseado em urina, sem potencializador, foram de 60% e 83,9%, respectivamente, enquanto a sensibilidade e especificidade do ELISA baseado em urina foram de 93,3% e 93,5%, respectivamente.

Em relação ao método ELISA, ele é empregado na busca de anticorpos específicos em amostras biológicas, baseando-se no princípio fundamental de interação antígeno-anticorpo por meio de uma reação enzimática (Mineo, *et al.* 2016). Este método é amplamente utilizado em pesquisas de aprimoramento de diagnóstico de leishmanioses e na comparação de desempenho de diferentes testes imunológicos (Freire *et al.*, 2021). Nas últimas três décadas, a urina vem sendo aplicada na pesquisa de anticorpos em cães e humanos com LV. No entanto, ainda não há ainda estudos relacionados à pesquisa de imunoglobulinas em pacientes com LT.

Em cães, a ELISA de urina utilizando como antígeno a Proteína A diagnosticou a presença de anticorpos IgG2 anti-*leishmania* no trato urinário de cães proteinúricos infectados por *L. infantum*, fornecendo informações importantes sobre o prognóstico de glomerulonefropatias (Solano-Gallego *et al.*, 2003). No estudo de Todolí *et al.* (2009), trinta e oito dos 64 (59,4%) cães positivos apresentaram quantidades significativas de IgG anti-*leishmania* na urina. Enquanto, para IgA, apenas 19 deles (38%) foram positivos para este isotipo. A relação entre altos índices de proteinúria e a presença destes isotipos de imunoglobulinas sugerem que a determinação de IgG e IgA pode ser usada como uma ferramenta prognóstica mais específica em cães com leishmaniose que sofrem de danos renais mais graves. Embora os resultados corroborem, ambos os estudos apresentam limitações e exigem maior robustez de dados.

Em humanos, ao buscar IgG na urina de pacientes com LV utilizando antígeno de promastigota de *L. donovani* tratado com acetona, os resultados de Islam *et al.* (2002) revelaram uma sensibilidade e especificidade de 95,0% e 95,3%, respectivamente. Em contraste, os isotipos IgA e IgM exibiram sensibilidades mais baixas, com 37,8% para IgA e 66,7% para IgM. Em 2012, o mesmo autor, diante do alto desempenho de uma ELISA que detecta IgG na urina usando o antígeno rKRP42 para o diagnóstico de LV, propõe a aplicação do teste em populações assintomáticas de áreas endêmicas. Isso se deve aos elevados títulos urinários de IgG ( $\geq 1.000$  U) encontrados em alguns indivíduos, os quais podem antecipar casos clínicos potenciais de LV, possibilitando a identificação precoce de surtos (Islam *et al.* 2012).

Na avaliação de antígenos variados por Ghosh e colaboradores (2016), as proteínas recombinantes rK39, rK28 e rKRP42, derivadas de *L. chagasi*, exibiram, na ELISA de urina, sensibilidades de 94,3%, 95,4% e 90,8%, respectivamente. Entre elas, rK28 e rKRP42 demonstraram a mesma especificidade (96,3%), enquanto rK39 apresentou uma especificidade ligeiramente superior, atingindo 97,5%.

No estudo de Ejazi e equipe (2016) utilizando SLA de *L. donovani*, os resultados mostraram-se bastante promissores quando utilizado urina, uma vez que a ELISA apresentou 100% de especificidade e sensibilidades de 97,94%, além do alto potencial diagnóstico apresentado quando este antígeno foi aplicado a testes imunocromatográfico posteriores (Ejazi *et al.*, 2016; 2021). Embora tenha

apresentado resultados potenciais, o SLA de *L. donovani* ainda está sujeito a limitações de reatividade cruzada intrínsecas ao próprio antígeno, o qual não foi testado no estudo citado.

Ademais, pesquisas recentes destacaram o antígeno recombinante RDK2 de *Leishmania donovani* como uma ferramenta diagnóstica altamente promissora para a leishmaniose visceral. Utilizando amostras de urina para a detecção de IgG, o teste apresentou sensibilidade de 93,8% e especificidade de 85,7%. Já em amostras de soro, a sensibilidade foi de 78% e a especificidade de 86,67%, quando comparadas a controles saudáveis e indivíduos com outras doenças (Bhattacharyya *et al.*, 2022).

Embora a concentração de anticorpos na urina seja apenas cerca de 1/4.000 a 1/10.000 daquele presente no soro (Nagaoka *et al.*, 2021), destaca-se o vasto potencial de tais ferramentas diagnósticas não invasivas, particularmente a ELISA baseada em urina. Notavelmente, não foram encontradas publicações abordando a pesquisa de anticorpos urinários em pacientes com leishmaniose tegumentar, ressaltando uma lacuna no conhecimento científico nesse contexto.

Por fim, o mecanismo de ação que resulta na presença de anticorpos urinários em humanos com leishmaniose ainda permanece pouco compreendido pela ciência. Postulou-se que o limite de peso molecular (PM) para a filtração glomerular se situe entre 30 a 50 kDa (Roksnoer *et al.*, 2016), enquanto que a detecção da presença de albumina urinária (67 kDa) é amplamente reconhecida como um indicativo de lesões na barreira de filtração glomerular. As imunoglobulinas apresentam um PM maior: IgG, 150kDa; IgA ~385kDa; IgE 200kDa; IgD 180kDa; IgM, 900kDa (Muhammed, 2020).

Neste contexto, estudos em cães com LV conduzidos por Sollano-Gallego *et al.* (2003) indicam uma correlação entre o extravasamento de IgG e o desenvolvimento de proteinúria não seletiva nestes animais com lesão glomerular. Os achados observados sugerem que a detecção de anticorpos específicos contra *Leishmania* na urina de cães é primariamente atribuída à passagem para o trato urinário de imunoglobulinas provenientes do sangue, com uma contribuição secundária da produção local de anticorpos IgA, sugerida também por Todolí e colaboradores (2009). Segundo os autores, esta suposta produção local de anticorpos anti-*Leishmania* no trato urinário pode ser explicada pela predominância

de lesões de nefrite tubulointersticial em cães ou por danos em outros órgãos urinários e genitais.

Em humanos LV, não há estudos que discutam o mecanismo envolvido na presença de fragmentos ou anticorpos íntegros na urina humana, embora pacientes com a forma visceral crônica comumente apresentem disfunções renais e proteinúria devido a infecção (Silva-junior *et al.*, 2014), podendo ser razoável a hipótese de extravasamento glomerular de imunoglobulinas relacionado a danos. São escassos os dados disponíveis sobre disfunção renal na LT, sendo as alterações renais descritas geralmente associadas ao tratamento com antimoniais pentavalentes. Observa-se que em alguns casos de LT, pacientes podem desenvolver lesão renal aguda, atribuída à deposição significativa de complexos imunes circulantes, que surge após a destruição dos parasitos (Oliveira *et al.*, 2011; Silva-junior *et al.*, 2014). Nesse contexto, torna-se imperativo realizar pesquisas específicas na área de fisiologia renal e fisiopatologia das leishmanioses para esclarecer de forma mais abrangente essa questão.

## 2.7. IMUNOPROTEÔMICA APLICADA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O emprego de preparações antigênicas de *Leishmania* em ensaios de imunodeteção de anticorpos para o diagnóstico de LT tem apresentado parâmetros variáveis, os quais podem estar relacionados à diversidade na preparação do antígeno e às diferenças antigênicas entre isolados e espécies do parasito (Freire *et al.*, 2021). A possibilidade de reatividade cruzada com outras doenças infecciosas também frequentemente compromete a especificidade dos testes (Caballero *et al.*, 2007). Além disso, pacientes de LC produzem níveis reduzidos de anticorpos anti-*Leishmania*, levando ao crescente interesse em antígenos de alta sensibilidade para aprimorar ensaios imunológicos (Romero *et al.*, 2005). Neste sentido, avanços biotecnológicos e metodologias de alto rendimento, como a imunoproteômica, possibilitam a busca por biomarcadores antigênicos mais precisos, otimizando parâmetros diagnósticos (Ludolf; Ramos; Coelho, 2023).

A técnica de imunoproteômica desempenha papel crucial, permitindo trabalhar com um número considerável de antígenos e ampliando as perspectivas de sucesso em estudos relacionados (Ludolf; Ramos; Coelho, 2023). O procedimento

inclui a preparação e separação das proteínas de *Leishmania* spp. por meio de eletroforese bidimensional, seguida por experimentos de imunotransferência através de SDS-PAGE e a posterior identificação das marcas proteicas utilizando a espectrometria de massa (Coelho *et al.* 2012; Duarte *et al.* 2016).

Baseado nesta potente técnica para o diagnóstico de LT, alguns estudos destacam-se na identificação de novos antígenos. Na imunoproteômica de Duarte e colaboradores (2015) foi possível identificar cinco proteínas de *L. braziliensis* com elevado potencial para o sorodiagnóstico da LT em seres humanos. Além disso, no trabalho de Lima *et al.* (2017), foram destacadas nove proteínas para *L. amazonensis* e duas proteínas para *L. braziliensis*, consideradas abundantes e imunorreativas em relação aos soros de indivíduos com LT. Ambas as pesquisas evidenciam avanços importantes na identificação de novos antígenos para a melhoria dos imunodiagnósticos da LT.

A aplicação dos antígenos identificados tem sido viabilizada pelo uso da tecnologia de DNA recombinante, que possibilitou a clonagem molecular de diversos genes de *Leishmania* codificadores de proteínas antigênicas, passíveis de utilização na imunodeteção de anticorpos específicos após sua expressão e purificação (Maia; Campino, 2008). Para esse fim, *Escherichia coli* (*E. coli*) é amplamente empregada como hospedeiro inicial de expressão, em virtude de sua rápida taxa de crescimento, facilidade de manipulação e baixo custo de cultivo, características que, aliadas a abordagens de alto rendimento, podem resultar uma relação custo-benefício particularmente vantajosa (Jia; Jeon, 2016). Ademais, os métodos baseados nessa tecnologia permitem a construção de poliproteínas ou a incorporação de epítopos complementares em um único produto, ampliando as possibilidades para o desenvolvimento de plataformas diagnósticas (Duthie; Reed, 2017; Bhattacharyya *et al.*, 2022).

### **2.7.1 Identificação de epítopos específicos de células B aplicada a LT**

No contexto do avanço na descoberta de novos alvos para o imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar, um dos desafios proeminentes reside na identificação da região antigênica capaz de desencadear uma resposta imunológica. O domínio das ferramentas de bioinformática, métodos computacionais

para detecção antigênica e previsão de epítomos específicos, marca um salto tecnológico significativo no aprimoramento dos testes, além de apresentarem baixo custo e alta velocidade quando comparado aos métodos convencionais (Sun *et al.* 2013; De Brito *et al.*, 2020). Essas abordagens *in silico* oferecem meios valiosos para alcançar o objetivo de identificar marcadores imunogênicos essenciais no desenvolvimento de vacinas, fármacos, marcadores diagnósticos e prognósticos para as leishmanioses (Costa *et al.*, 2023).

Um epítomo de célula B é uma região de um antígeno reconhecida por um receptor específico de célula B (BCR) ou, posteriormente, pelo anticorpo induzido pela resposta humoral. Os epítomos lineares, também denominados contínuos, são compostos por aminoácidos consecutivos, enquanto os epítomos conformacionais, ou descontínuos, consistem em aminoácidos sequenciais decorrentes do dobramento espacial, como observado na proteína intacta da qual são derivados (Peters *et al.*, 2005; Singh, Ansari; Raghava; 2013). Para aplicações envolvendo alvos proteicos em seu estado nativo, como terapias ou citometria de fluxo, os epítomos conformacionais podem ser preferidos. Em contraste, os epítomos lineares podem ser mais indicados para aplicações em que a proteína alvo é desnaturada total ou parcialmente durante a preparação da amostra antes do imunoenensaio, como *Western blot*, imuno-histoquímica e outras técnicas (Forsström *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de peptídeos sintéticos derivados de epítomos lineares destaca-se pelas vantagens distintas que oferece, incluindo custos relativamente mais acessíveis, maior praticidade e aplicabilidade (Noya *et al.*, 2003). Além disso, diversos estudos apresentam evidências da aplicabilidade eficaz de peptídeos, como os abordados na revisão sistemática conduzida por Pagniez e colaboradores (2023), corroborando os índices satisfatórios de sensibilidade e especificidade tanto para o sorodiagnóstico da LV quanto para a LT. Dessa forma, a aplicação da abordagem computacional, em conjunto com o uso de proteínas recombinantes, foi adotada no presente estudo, visando explorar seu expressivo potencial como contribuição significativa para aprimorar a precisão e eficácia dos testes de imunodeteção de LT.

## 2.8 ANTÍGENO eIF5A

A proteína recombinante Fator de Iniciação Eucariótico 5a (eIF5A) (LbrM.25.0580), referência NCBI XP\_001565563.1, utilizada no presente trabalho, foi primariamente identificada em extratos proteicos de *Leishmania chagasi* reconhecida por anticorpos presentes no soro de cães com LV assintomática e sintomática (Coelho *et al.* 2012). Em 2015, a mesma proteína foi identificada por Duarte e colaboradores por meio de uma abordagem imunoproteômica visando a identificação de antígenos em extratos totais de formas promastigotas e formas amastigotas em fase estacionária de *Leishmania braziliensis* utilizando soros de pacientes LT.

No estudo citado, em testagem em ELISA indireta, a eIF5A exibiu valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 92,5%, respectivamente, demonstrando reação cruzada significativamente baixa com *Trypanosoma cruzi*. Outro estudo, baseado em *Leishmania braziliensis*, também indicou sensibilidade de 100% e especificidade de 97.78% desta proteína recombinante (Lima *et al.*, 2018). Nesse sentido, esses resultados apresentam o potencial do uso desta proteína como antígeno promissor no diagnóstico da LT.

A eIF5A localiza-se predominantemente no citoplasma da *Leishmania*, sendo altamente conservada desde archaea até mamíferos. Sua função é promover a formação da primeira ligação peptídica no início da síntese proteica, desempenhando um papel essencial nesse processo em uma ampla gama de organismos (Singh *et al.*, 2014). A proteína possui uma sequência de 166 aminoácidos com peso molecular aproximado de 17,8 kiloDaltons (kDa) e ponto isoelétrico (pI) estimado de pH 4,62 (ProtParam Tool, 2023). É uma proteína de *Leishmania* conservada em diversas espécies do parasito, como *L. infantum* e *L. mexicana*, apresentando 97% e 96% de valor de identidade, respectivamente. Embora a proteína eIF5A também esteja presente em outros protozoários, como *Trypanosoma* spp. e *Schistosoma* spp., observam-se variações significativas em sua sequência, sendo o protozoário de importância mais próximo da homologia o *Trypanosoma cruzi*, com 76.65% de similaridade (BLAST, 2023).

No presente estudo, foi analisado as sequências de aminoácidos desta proteína antigênica da *L. braziliensis*, previamente identificadas em estudos imunoproteômicos anteriores, com o objetivo de prever epítomos lineares de

células B. Portanto, foi testada a versão recombinante da eIF5A e de seu epítipo derivado, na forma de peptídeo sintético, como ferramentas para o imunodiagnóstico. Essas ferramentas foram empregadas na detecção de anticorpos urinários e sorológicos da leishmaniose tegumentar.

**OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antigênico da proteína Fator de Iniciação Eucariótico 5a (eIF5A) (LbrM.25.0580) de *Leishmania braziliensis*, em sua forma recombinante, e de peptídeo sintético específico de linfócitos B, para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar usando urina dos pacientes.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar a proteína Fator de Iniciação Eucariótico 5a de *L. braziliensis*;
- Identificar epítomos específicos de linfócitos B da proteína utilizando *softwares* de bioinformática;
- Sintetizar quimicamente os epítomos preditos pela técnica de *Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis*;
- Avaliar comparativamente a proteína recombinante, o peptídeo sintético e o extrato antigênico solúvel dos parasitos em ensaios de ELISA indireta usando amostras de soro e urina pareadas de pacientes com LT e indivíduos saudáveis;
- Sugerir parâmetros preliminares de sensibilidade e especificidade frente aos diferentes antígenos e às amostras de urina e soro dos pacientes.

***MATERIAIS E MÉTODOS***

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG) com os números de processo CAAE-323431.14.9.0000.5149 e CAAE CAAE-94476318.8.0000.5149 e COEP do Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, processo CAAE-78052017.1.0000.5091. Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### 4.2 AMOSTRAS

Este estudo empregou uma "amostra de conveniência", definida pela disponibilidade e exequibilidade das amostras para o estudo. As amostras de urina foram coletadas no período de fevereiro de 2022 a setembro de 2023, em paralelo às amostras de sangue. A coleta de urina foi realizada em qualquer momento do dia, sem um horário fixo de retenção vesical; no entanto, recomendou-se a coleta de urina pela manhã ou após um período médio de retenção de aproximadamente 4 horas, sempre que possível.

As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção venosa, utilizando tubo estéril de coleta de 5 mL à vácuo com ativador de coágulo e gel separador. Posteriormente, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a 3.500 rpm, durante 15 min, a uma temperatura de 4 °C. O soro resultante foi cuidadosamente coletado e armazenado em tubos do tipo Eppendorf, de 2 mL preservados a uma temperatura de -20 °C até o momento de utilização.

Para a coleta de urina, foram utilizados frascos coletores universais estéreis de 80 mL. O conteúdo coletado foi transferido para tubos de 15 mL contendo azida sódica (71289, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) em uma concentração final de 0,1% (v/v). Esses tubos foram devidamente transportados em temperatura ambiente e armazenados a uma faixa de temperatura entre 2 a 8 °C até o momento da utilização.

### 4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes foram recrutados no ambulatório de otorrinolaringologia do Hospital São Geraldo da UFMG (Belo Horizonte, Brasil) e no ambulatório de referência em leishmanioses da Policlínica Municipal Dr. Roberto Shuffner de Teófilo Otoni (Teófilo Otoni, Brasil). Todas as coletas foram realizadas antes do início do tratamento. O grupo controle de indivíduos sadios de região endêmica foi composto por voluntários residentes na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Para as análises, foram aplicadas as amostras pareadas de pacientes com Leishmaniose Cutânea (LC) (n = 21) - 11 homens e 10 mulheres, com idades entre 12 e 94 anos - e de pacientes com Leishmaniose Mucosa (LM) (n = 25) - 17 homens e 6 mulheres, com idades entre 30 e 90 anos. Ambos os grupos residiam em áreas endêmicas de Minas Gerais. O diagnóstico foi confirmado por critérios clínico-epidemiológicos associados a métodos laboratoriais. Fragmentos de biópsia de pele ou mucosa lesionada foram destinados ao diagnóstico parasitológico para a busca de parasitos nos tecidos. Paralelamente, também foi utilizado métodos moleculares, como a PCR para a detecção do kDNA de *L. braziliensis*. É relevante observar que nenhum dos pacientes havia recebido tratamento no momento da coleta das amostras. Nenhum dos casos possuía história pregressa de doenças infecto-parasitárias com potencial de reação cruzada.

Como grupo de controle, foram coletadas amostras de indivíduos saudáveis residentes em áreas endêmicas (n=45), composto por 25 homens e 20 mulheres, com idades entre 17 e 50 anos, em Belo Horizonte. Esses participantes não manifestaram sinais ou sintomas de Leishmaniose Tegumentar (LT) e não possuíam histórico de doenças que pudessem gerar confusão nos resultados.

### 4.4 PREPARO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE *Leishmania braziliensis*

Extrato solúvel antigênico (SLA) de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904), foi preparado como descrito previamente por Coelho *et al.* (2003). Brevemente, formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB, Sigma), 20 Mm de L-glutamina, 100U/mL de

penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4. As culturas foram quantificadas, e a concentração de  $2 \times 10^8$  parasitos/mL foi centrifugada a 2.000 x G por 10 minutos (min). Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com PBS 1x estéril; sendo que uma nova centrifugação foi realizada a 2.000 x G por 10 min, a 4°C. Esse passo foi realizado três vezes. Após a última centrifugação, o *pellet* foi congelado a -80°C até o momento do uso.

#### 4.5 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A proteína recombinante eIF5A *braziliensis* (XP\_001565563.1 - *putative eukaryotic initiation factor 5a* [*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904]) foi clonada a partir do DNA genômico deste *parasito*, seguindo os protocolos estabelecidos por Duarte *et al.*, 2015. Os plasmídeos recombinantes foram introduzidos em células *E. coli* BL21 eletrocompetentes (Agilent Technologies) por eletroporação, utilizando um aparelho de eletroporação MicroPulser (Bio-Rad Laboratories). A correta inserção das sequências foi confirmada por sequenciamento com o primer T7 (Macrogen, Coreia do Sul). As proteínas recombinantes foram expressas pela adição de 1,0 mM de IPTG (isopropil-β-d-tiogalactopiranosse) (Promega, Canadá) por 24 horas a 12°C, com agitação a 200 x G por minuto. Em seguida, as células foram lisadas por sonicação (com pulsos contínuos de 30 s, com intervalos de 15 s entre eles, a 38 MHz) e centrifugadas a 13.000 x G por 20 min a 4°C.

As proteínas recombinantes foram purificadas em condições não desnaturantes, utilizando colunas His-Trap de 5 ml (*GE Healthcare Life Science*) acopladas a um sistema de cromatografia líquida de proteínas rápida (FPLC) (*GE Healthcare Life Science*). Após a purificação, as proteínas recombinantes foram passadas por uma coluna de polimixina-agarose (Sigma) para remover o conteúdo residual de endotoxina. Além disso, para verificar a pureza, os produtos purificados foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%.

#### 4.6 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS ESPECÍFICOS DE CÉLULAS B

Para prever os epítomos da proteína eIF5A, inicialmente, realizou-se a obtenção da sua estrutura primária, com a sequência FASTA consultada por meio do acesso ao banco de dados online Genbank. Após obter a sequência, empregou-se o programa de bioinformática Blast-p (protein-protein BLAST) para realizar comparações de similaridade com outras sequências proteicas presentes no banco de dados. Nesse processo, utilizou-se a sequência de aminoácidos da proteína em análise, com o parâmetro *non-redundant protein sequences*, identificando assim as sequências com as maiores similaridades. Nesta etapa, foram consideradas apenas as similaridades referentes às principais espécies de *Leishmania* responsáveis pelas formas visceral e tegumentar.

Por meio do programa IEDB ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)), identificaram-se aminoácidos na estrutura primária da eIF5A com a maior probabilidade de estarem acessíveis. Os parâmetros de análises utilizados foram os de valores de *window size*: 14 e de *Threshold*: 1.0. Os aminoácidos que foram considerados positivos nesta análise foram então destacados na estrutura da proteína. Com base nisso, a predição de epítomos foi realizada pelo programa de bioinformática ABCpred ([www.imtech.res.in/raghava/abcpred/](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/)).

Ao prever os possíveis epítomos, as sequências proteicas foram alinhadas usando o programa Clustal Omega. Dessa maneira, as proteínas de *Leishmania* foram alinhadas e analisadas quanto à similaridade em comparação com outras proteínas do mesmo gênero, como: *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. major* e *L. donovani*. As regiões epitópicas da sequência analisada foram comparadas com as sequências similares obtidas pelo Blast-p das proteínas de *Leishmania*. Posteriormente, esse epítomo foi sintetizado como peptídeo para aplicação nos testes.

#### 4.7 SÍNTESE DO PEPTÍDEO SELECIONADO

O peptídeo predito foi sintetizado no Laboratório de biotecnologia aplicado ao desenvolvimento de novos fármacos da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, Santa Catarina, empregando a técnica química de *Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis*, conforme descrita por Merrifield (1969) e adaptada por

Machado-de-Ávila *et al.* (2011). O procedimento envolve a fixação do aminoácido C-terminal do peptídeo em uma resina insolúvel, seguido pelo alongamento da cadeia peptídica através de adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Esse processo inclui a desproteção do grupamento *Fmoc* (*Fluorenil-metiloxicarbonila*) com Piperidina 25%, lavagens sequenciais com DMF (dimetilforamida), DCM (diclorometano), MET (metanol), realização do teste de Kaiser (azul de bromofenol) e a ligação do aminoácido em ciclo até o último resíduo da sequência.

Na etapa final, os grupamentos protetores da cadeia lateral são removidos, e o peptídeo é liberado da resina por meio de uma solução de clivagem composta por 25  $\mu$ L (25%) de água destilada, 25  $\mu$ L (25%) de TES (trietilsilano) e 950  $\mu$ L (95%) de TFA (ácido trifluoracético). Essa solução foi incubada por 3 horas na seringa e filtrada após este período. Em seguida, éter etílico foi adicionado e incubado *overnight*. No dia seguinte, a centrifugação a 4°C por 10 minutos a 4500 rpm foi realizada, seguida pela adição de éter etílico e repetição da centrifugação. Após retirar o éter etílico, o material obtido foi submetido à liofilização. Para uso em teste, o peptídeo liofilizado foi reconstituído em água Milli-Q na concentração de 1 mg/mL.

## 4.8 ELISA

A metodologia de ELISA indireta foi realizada seguindo as condições experimentais ideais para cada tipo de antígeno utilizado: proteína recombinante eIF5A (XP\_001565563.1) e seu peptídeo sintético predito, aplicando como amostras biológicas urina ou soro humanos. Realizaram-se curvas de titulação com o propósito de determinar as concentrações mais apropriadas dos antígenos e a diluição da urina e soro para os experimentos.

### 4.8.1. ELISA baseada em urina

As placas de poliestireno (96 well *MicroWell*<sup>™</sup> *MaxiSorp*<sup>™</sup> *flat bottom plate*, Thermo Fisher Scientific, *Denmark*) foram revestidas com a proteína recombinante eIF5A (1,0  $\mu$ g/poço), peptídeo (0,25  $\mu$ g/poço) e SLA *L. braziliensis* (1,0  $\mu$ g/poço), diluídos em tampão carbonato por 16 h a 4°C. Após a sensibilização, as placas

foram submetidas a 3 lavagens com uma solução de PBS 1x e Tween 20 0,05% (PBS-T) e realizou-se o bloqueio com 200  $\mu$ L de uma solução contendo PBS 1x e albumina de soro bovino (BSA) 5% por 2 h a 37 °C.

Em seguida, as placas foram submetidas a 3 lavagens com PBS-T e incubadas com 100  $\mu$ L de urina não diluída por 1 h a 37 °C. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com 100  $\mu$ L de anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase, na diluição de 1:5.000 (A18811, Invitrogen) em PBS 1x e BSA 1% por 1 h a 37 °C. Novamente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T, e as reações foram reveladas utilizando 50  $\mu$ L/poço da solução cromogênica TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina linear, Scienco, Brasil) por 20 min e no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e a densidade óptica (OD) foi medida em um espectrofotômetro para microplacas de ELISA (*Molecular Devices, Spectra Max Plus*, Canada) a  $\lambda$ 450 nm. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as placas.

#### **4.8.2 ELISA baseada em soro**

A critério de validação do ensaio, foi efetuada uma comparação da eficiência do ELISA entre amostras de urina e soro pareadas. Os ensaios com amostras de soro seguiram o protocolo mencionado anteriormente, com algumas modificações incorporadas. A sensibilização das placas foi realizada utilizando a proteína recombinante eIF5A (1,0  $\mu$ g/poço), peptídeo sintético (0,25  $\mu$ g/poço) e SLA *L. braziliensis* (1,0  $\mu$ g/poço), com a diluição de soro (1:100) em PBS 1x e BSA 1% e anticorpo anti-IgG (A18811, Invitrogen) 1:20.000, com tempos de incubações de 30 min cada.

#### **4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

O tamanho amostral foi determinado por conveniência para este estudo preliminar. Os dados foram compilados para planilhas de Excel e as análises foram conduzidas por meio do programa *GraphPad Prism* (versão 6.0 para *Windows*). A partir dos resultados obtidos das absorvâncias (ABS) nos testes ELISA, foram estabelecidos os pontos de corte (*cut-off*) para validação da sensibilidade e

especificidade dos antígenos que foram determinados após a construção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*), além da análise do intervalo de confiança de 95% (IC) destes parâmetros.

As curvas ROC foram desenhadas com base nos valores dos controles saudáveis residentes em área endêmica *versus* os valores dos testes dos pacientes de LT (LM e LC, discriminadamente). Nesta etapa para análise do desempenho da ELISA, os seguintes parâmetros foram avaliados: Sensibilidade (Se) = valores verdadeiros positivos / total de positivos (verdadeiros positivos + falsos negativos); Especificidade (Es) = valores verdadeiros negativos / total de negativos (falsos positivos + verdadeiros negativos); intervalo de confiança (IC 95%); Acurácia (AUC) = área sob a curva (verdadeiro positivo + verdadeiro negativo / Positivos + negativos).

**RESULTADOS**



## 5.2. POTENCIAL DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS reIF5A, PEPTÍDEO SINTÉTICO E SLA DE *L. braziliensis* UTILIZANDO SORO HUMANO

O ELISA foi realizado utilizando amostras de soro de 21 participantes com LC, 25 participantes com LM e 45 indivíduos saudáveis de região endêmica para detectar anticorpos anti-*Leishmania* utilizando como antígenos reIF5A, peptídeo e SLA de *L. braziliensis*. Os valores de corte para positividade e negatividade foram determinados pela curva ROC após análise dos valores de absorbância em 450 nm (Figura 11). Os valores da área sob a curva (reIF5A = 0,90; Peptídeo = 0,87; SLA = 0,84) para cada um dos antígenos indicaram um grande potencial diagnóstico, uma vez que o valor de AUC igual a 1 representa uma acurácia de 100%. Os valores de corte de reIF5A, peptídeo e SLA foram 0,0625, 0,5505 e 0,1530, respectivamente (Tabela 1).

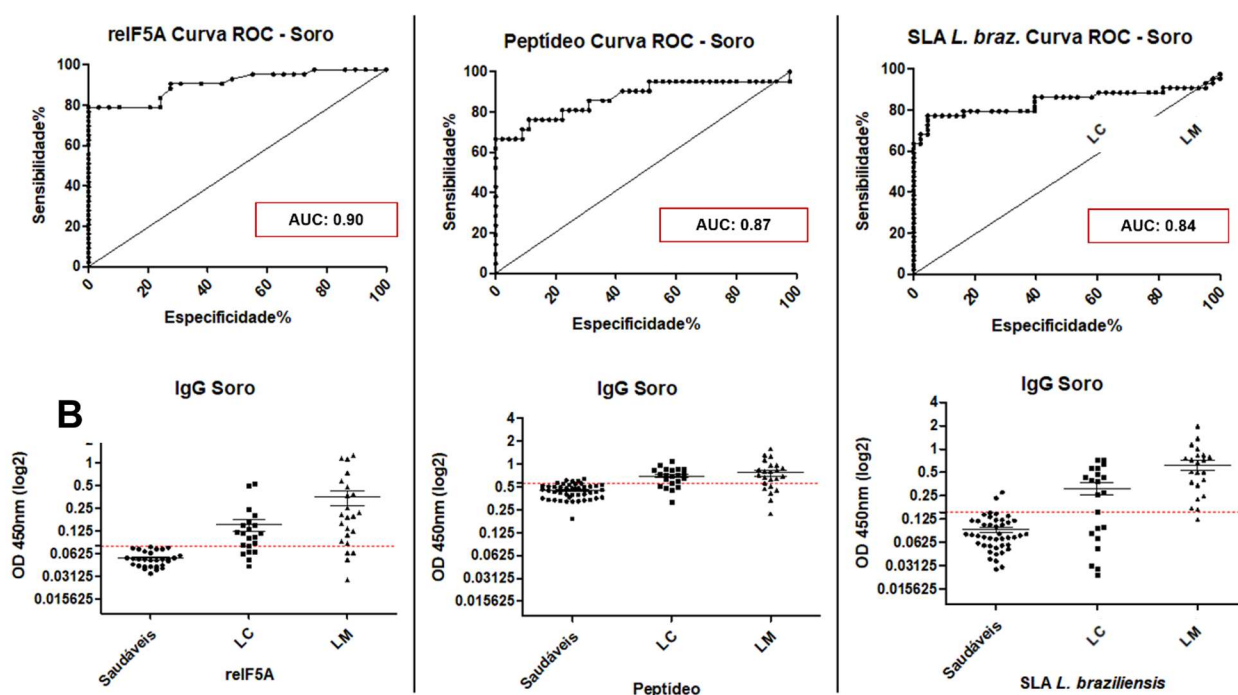


Figura 11. Avaliação da reatividade do ELISA com os antígenos reIF5A, peptídeo e SLA de *Leishmania braziliensis* usando um painel sorológico humano. Os três antígenos foram empregados nos ensaios de ELISA realizados com amostras de soro de humanos dos seguintes grupos: pacientes com leishmaniose cutânea (LC), n = 21, pacientes com leishmaniose mucosa (LM), n = 25 e indivíduos saudáveis de região endêmica (Saudáveis), n = 45. A curva ROC obtida para cada uma das proteínas e área sob a curva (AUC) calculada (A). Os valores individuais de OD são mostrados (B). A linha pontilhada em vermelho representa o ponto de corte calculado por uma análise de ROC.

Com base nos valores de corte, o rIF5A mostrou a maior sensibilidade (79,07%) com sensibilidade ligeiramente menor do peptídeo e SLA (76,19% e 77,27%, respectivamente). Quanto a especificidade, a rIF5A demonstrou maior valor (100%), enquanto o peptídeo e o SLA mostraram especificidade de 88,89% e 95,35%, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1. Soro**

Antígeno	AUC	95%CI	Cut-off	Se	95%CI	Es	95%CI	AC%
eIF5A	0.90	0.83-0.97	0.0625	79.07	63.96%-89.96%	100	88.06%-100.0%	90.70
Peptídeo	0.87	0.76-0.98	0.5595	76.19	52.83%-91.78%	88.89	75.95%-96.29%	87.51
SLA <i>L. braz.</i>	0.84	0.74-0.93	0.1530	77.27	62.16%-88.53%	95.35	84.19%-99.43%	84.28

Tabela 1. Potencial diagnóstico dos antígenos para o sorodiagnóstico da leishmaniose tegumentar. Curvas ROC foram utilizadas para determinar a sensibilidade (Se), especificidade (Es), intervalo de confiança (IC 95%) e área sob a curva (AUC) de cada antígeno diagnóstico.

### 5.3 POTENCIAL DIAGNÓSTICO DOS ANTÍGENOS rEIF5A, PEPTÍDEO SINTÉTICO E SLA DE *L. braziliensis* UTILIZANDO URINA

O ensaio de ELISA foi realizado utilizando urina como o analito de teste. Com base nos valores de corte derivados da curva ROC, os pontos de corte para rEIF5A, peptídeo e SLA de *L. braziliensis* foram definidos como 0,0625, 0,2295 e 0,1265, respectivamente (Figura 12, Tabela 2). Os valores da área sob a curva (eIF5A = 1,0; peptídeo = 0,85; SLA = 0,94) obtidos a partir da análise da curva ROC para a proteína recombinante e SLA na urina foram superiores àqueles no soro, sobressaindo-se a eIF5A que apresentar um valor de AUC igual a 1, sugerindo a acurácia de 100% nos resultados preliminares. O peptídeo sintético derivado do epítipo específico de célula B da eIF5A apresentou um valor de AUC ligeiramente menor ao do soro (AUC = 0,87 para soro contra 0,85 na urina), mantendo-se ainda expressivo.

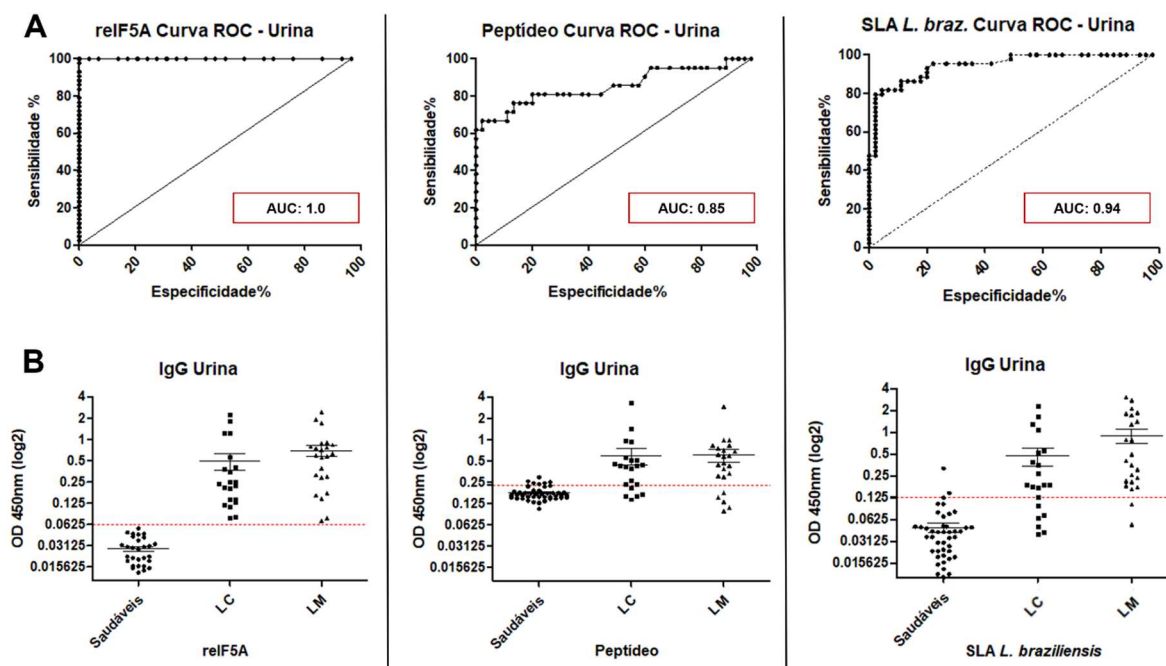


Figura 12. Avaliação da reatividade do ELISA com os antígenos relF5A, peptídeo e SLA de *Leishmania braziliensis* usando um painel de urinas humanas. Os três antígenos foram empregados nos ensaios de ELISA realizados com amostras de urina dos seguintes grupos: pacientes com leishmaniose cutânea (LC), n = 21, pacientes com leishmaniose mucosa (LM), n = 25 e indivíduos saudáveis de região endêmica (Saudáveis), n = 45. A curva ROC obtida para cada um dos antígenos e área sob a curva (AUC) calculada (A). Os valores individuais de OD são mostrados (B). A linha pontilhada em vermelho representa o ponto de corte calculado por uma análise de ROC.

De acordo com esses valores, relF5A, peptídeo e SLA demonstraram sensibilidade de 100%, 86,67% e 95,56%, respectivamente. Entre os três antígenos avaliados, a proteína recombinante eIF5A destacou-se novamente, uma vez ter apresentado o valor máximo de especificidade (100%), enquanto o peptídeo e o SLA apresentaram 86,67% e 95,56%, respectivamente.

Tabela 2. Urina

Antígeno	AUC	95%CI	Cut-off	Se	95%CI	Es	95%CI	AC%
eIF5A	1.00	1.00-1.00	0.0625	100	91.78%-100.0%	100	88.06%-100.0%	100
Peptídeo	0.85	0.74-0.97	0.2295	76.19	52.83%-91.78%	86.67	73.21%-94.95%	85.61
SLA <i>L. braz.</i>	0.94	0.90-0.99	0.1265	81.82	67.29%-91.81%	95.56	84.85%-99.46%	94.75

Tabela 2. Potencial diagnóstico dos antígenos para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar utilizando urina humana. Curvas ROC foram utilizadas para determinar a sensibilidade (Se), especificidade (Es), intervalo de confiança (IC 95%) e área sob a curva (AUC) de cada antígeno diagnóstico.

Nesse cenário, os resultados indicaram que a eIF5A exibiu maior capacidade na detecção de anticorpos IgG na urina, em comparação com o soro, permitindo uma melhor distinção entre indivíduos saudáveis e pacientes infectados. Além disso, tanto o peptídeo quanto o SLA demonstraram um significativo potencial de imunodeteção na urina, exibindo parâmetros comparáveis aos observados no soro.

***DISCUSSÃO***

## 6. DISCUSSÃO

O diagnóstico da LT fundamenta-se em critérios clínicos combinados com diversos diagnósticos laboratoriais. Para superar desafios no diagnóstico imunológico desta doença, frequentemente relacionados ao tipo de antígeno utilizado e aos baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* na maioria dos pacientes com a forma cutânea (Goto; Lindoso, 2012; Gomes, *et al.* 2014), foram utilizadas importantes abordagens biotecnológicas, como a imunoproteômica e o uso da bioinformática. Estas metodologias visam mapear proteínas e regiões antigênicas de *L. braziliensis* e outras espécies causadoras da leishmaniose tegumentar, com o propósito de aprimorar a precisão dos testes diagnósticos (Ludolf; Ramos; Coelho, 2022; Duarte *et al.* 2015).

Além destas considerações, o diagnóstico imunológico desta patologia demanda a coleta de fluidos corporais, geralmente o soro ou plasma, por meio de punção venosa. Entretanto, estudos em parasitos Trypanosomatidae apontam que a utilização de amostras biológicas não invasivas, como a urina, emerge como uma alternativa viável para detecção de anticorpos, além de apresentar uma coleta mais natural para os pacientes submetidos ao procedimento (Serenio *et al.*, 2020). A adoção da urina para este fim pode ser encarada como uma opção mais conveniente tanto para a prática clínica quanto para a vigilância epidemiológica, uma vez que permite aos pacientes coletarem suas próprias amostras, eliminando a necessidade de flebotomistas e reduzindo significativamente os riscos associados à transmissão de patógenos durante o manuseio (Eamudomkarn *et al.*, 2018, Nagaoka *et al.*, 2021).

No presente estudo, a capacidade de imunodeteção de anticorpos do tipo IgG em pacientes com Leishmaniose Tegumentar foi avaliada e comparada, empregando a forma recombinante da proteína Fator de Iniciação Eucariótico 5A de *Leishmania braziliensis* e seu epítipo específico de linfócitos B. A análise foi conduzida utilizando amostras pareadas de urina e soro como amostras biológicas, permitindo uma avaliação inicial de desempenho desses marcadores nos dois fluidos corporais. Esta abordagem revelou resultados preliminares importantes, indicando que ambos os antígenos possuem a capacidade de distinguir pacientes infectados

com LT de indivíduos saudáveis em regiões endêmicas, principalmente quando a urina é utilizada como amostra biológica.

Para a proteína rIF5A, foram atingidos valores máximos de sensibilidade e especificidade, ambos alcançando 100%, quando a urina foi utilizada como amostra. Os resultados obtidos com esta amostra não invasiva destacaram uma capacidade superior de imunodeteção em comparação ao uso de soros, os quais revelaram valores de sensibilidade de 79,07% e especificidade de 100%. Os resultados corroboram com pesquisas prévias que evidenciaram o alto potencial sorodiagnóstico desta proteína para a LT, revelando também uma baixa reatividade cruzada com *T. cruzi* e nenhuma com outros parasitos (Duarte *et al.*, 2015, Lima *et al.* 2018). Desse modo, as descobertas do presente estudo agora também destacam a viabilidade do uso da urina como uma alternativa promissora para detecção de anticorpos quando utilizada esta proteína recombinante como antígeno.

Para o peptídeo sintético derivado do epítipo específico de células B da eIF5A, foram obtidos valores promissores de sensibilidade (76,19%) e especificidade (86,67%) para ELISA à base de urina. Paralelamente, em amostras de soro pareadas, os resultados apresentam semelhança, revelando taxas de sensibilidade e especificidade de 76,19% e 88,89%, respectivamente. Em contrapartida, o SLA de *L. braziliensis*, empregado como antígeno de controle nos testes, obteve parâmetros semelhantes ou superiores quando utilizado em soro, apresentando 77,27% de sensibilidade e 95,35% de especificidade, e destacando-se na ELISA baseada em urina, demonstrando 81,82% e 95,56% de sensibilidade e especificidade, respectivamente.

Compreende-se que a utilização de fragmentos curtos contendo determinantes antigênicos potentes representa uma estratégia eficaz para minimizar reações inespecíficas (Freire *et al.*, 2021). Desta maneira, as razões para a identificação de falsos positivos entre os pacientes saudáveis e a diminuição nos parâmetros do peptídeo, quando comparado aos demais antígenos, podem não ser claras neste estudo preliminar com reduzido painel de amostras e ausência de amostras de reações cruzadas para controle.

Pode-se inferir que pequenos peptídeos lineares apresentam algumas limitações que podem interferir no desempenho do ensaio, como uma restrita adsorção passiva em placas de poliestireno, comumente empregadas em

procedimentos de ELISA, além da dificuldade em identificar anticorpos que reconhecem predominantemente epítomos conformacionais (Gómara; Haro, 2007). Adicionalmente, há a possibilidade de alteração da conformação do peptídeo durante transporte ou armazenamento, resultando na perda de sua função. Cabe destacar que a presença de algumas proteases em amostras biológicas, solventes e recipientes desprovidos de inibidores podem desestabilizar a estrutura peptídica (Aydin, 2015; Trier *et al.*, 2019).

Embora a sensibilidade e especificidade do peptídeo sintético sejam ligeiramente menores devido a adversidades pouco aprofundadas neste estudo e à ausência de amostras de reação cruzada para comparação de reatividade entre os grupos, este antígeno ainda revela uma importante capacidade de imunodeteção de anticorpos, tanto em urina quanto em soro, destacando-se como um antígeno promissor e com potencial aplicação. Assim, estudos futuros podem explorar a avaliação deste e de outros peptídeos lineares de bom desempenho de maneira individual ou para integrá-los a uma quimera polipeptídica diagnóstica de LT em ELISA baseada em urina, visto que um recente estudo de sorodiagnóstico desta doença utilizou epítomos de células B da eIF5A para construção de uma quimera funcional (Garcia *et al.*, 2021).

Por fim, o SLA de *Leishmania braziliensis* foi empregado como antígeno controle neste estudo. Embora tenha apresentado valores expressivos de sensibilidade e especificidade, é importante ressaltar que esses parâmetros podem ser significativamente reduzidos quando este extrato proteico é utilizado em testes com amostras de pacientes com doenças de potencial reatividade cruzada, um aspecto que não foi abordado neste estudo preliminar. A literatura científica evidencia que a aplicação do SLA em ensaios sorológicos de ELISA para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar tem demonstrado sensibilidade variável, sobretudo devido à preparação do antígeno e às diferenças antigênicas entre isolados e espécies de *Leishmania* (Romero *et al.*, 2005; Caballero, 2007). Ademais, a sua especificidade pode ser reduzida em mais de 50% devido a reatividade cruzada com outras doenças infecciosas de importância (Duarte *et al.*, 2015, Lima *et al.* 2018).

Diante dos dados apresentados, é notável a semelhança nos resultados encontrados entre os testes baseados na urina e nos ensaios baseados em soro

para cada antígeno, reproduzindo de modo semelhante os resultados observados em estudo prévios de proteínas recombinantes diagnósticas de Leishmaniose Visceral utilizando metodologia semelhante (Ghosh *et al.*, 2016; Ejazi *et al.*, 2016; Bhattacharyya *et al.*, 2022). Destaca-se, nessa avaliação preliminar, que o uso da urina apresenta parâmetros gerais superiores no diagnóstico da LT frente aos diferentes antígenos testados. Adicionalmente, é possível observar nos ensaios baseados em urina realizados neste estudo que a reatividade das amostras dos indivíduos controle é relativamente mais baixa em comparação com as amostras de soro, enquanto a dos pacientes positivos é mais elevada, permitindo uma distinção mais clara entre os pacientes infectados e os não infectados e reduzindo a possibilidade de falsos positivos quando aplicado o ponto de corte.

De modo geral, é importante que estudos futuros priorizem a avaliação criteriosa na comparação quantitativa das reatividades entre amostras de urina e soro, visto que a não definição de um tempo fixo de retenção urinária antes da coleta das amostras pode gerar variações na concentração de anticorpos. Itoh e colaboradores (2001), em seu estudo de identificação de anticorpos urinários na Filariose revelou que coletas de urina no início da manhã ou no final do dia apresentaram apenas pequenas variações nas unidades de anticorpos, mantendo todas as amostras positivas, sem interferências nos resultados do teste.

Um estudo com método semelhante para infecções por *Helicobacter pylori*, identificou que o nível de hidratação pode influenciar na concentração de anticorpos urinários, mantendo, no entanto, parâmetros satisfatórios de desempenho nos ensaios. Adicionalmente, observou-se que mudanças no pH da urina e a presença da microbiota não interferem de maneira significativa nos valores de absorvância do ELISA (Alemohammad; Foley; Cohen, 1993). Nesse sentido, a adição de azida sódica (NaN<sub>3</sub>) como conservante para o armazenamento de urina tornou-se popular para pesquisa com diferentes microorganismos, uma vez que essa substância desempenha a função de prevenir alterações no pH resultantes de contaminação e crescimento bacteriano (Alemohammad; Foley; Cohen, 1993; Ejazi *et al.*, 2016; Ejazi *et al.*, 2021; Ludolf *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2023), sendo aplicada também às amostras do presente estudo.

Pesquisas apontam que o uso da NaN<sub>3</sub> como conservante permitiu a detecção de anticorpos para LV nas amostras de urina armazenadas a 4°C por até 6

anos (EJAZI *et al.*, 2016). Além disso, Ludolf e colaboradores (2022), examinaram a estabilidade sem conservante deste espécime biológico de pacientes com COVID-19 durante cinco dias consecutivos e após 10 dias, e os dados revelaram que não houve alteração no desempenho do ensaio entre amostras frescas e armazenadas sem conservantes.

Os dados apresentados por estes estudos são importantes, mas ainda demandam pesquisas mais aprofundadas, as quais são essenciais para possibilitar inferências mais precisas sobre os fatores que impactam nos resultados do ELISA baseado em urina. Adicionalmente, destaca-se a importância crucial de futuras avaliações concentrarem-se em estudos envolvendo amostras de urina de pacientes com leishmaniose tegumentar, visando aprimorar a confiabilidade do diagnóstico. É essencial que as investigações subsequentes considerem também variáveis como comorbidades, proteinúria significativa e o uso concomitante de medicamentos, a fim de ampliar a compreensão e robustez dos resultados obtidos.

Por fim, reconhecemos a necessidade premente de reavaliar esses antígenos frente a um painel mais amplo de urinas e soros, abrangendo tanto pacientes saudáveis de regiões endêmicas quanto não endêmicas, como também pacientes com diversas formas de leishmaniose tegumentar e aqueles que apresentam doenças potencialmente de reação cruzada, como doença de Chagas, hanseníase, malária, paracoccidiodomicose, entre outras condições. Esta ampliação visa avaliar de maneira mais assertiva o desempenho e a aplicabilidade destes antígenos diagnósticos nos ensaios utilizando urina para o diagnóstico da LT. Em nosso estudo preliminar, a ELISA baseada em urina emerge como uma ferramenta promissora para diagnóstico alternativo e não invasivo da leishmaniose tegumentar, fornecendo parâmetros de sensibilidade e especificidade notáveis, especialmente quando aplicada à proteína recombinante eIF5A e seu epítipo específico.

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho indica avanços na busca por métodos diagnósticos eficientes e menos invasivos para a leishmaniose tegumentar. A investigação da utilização da urina como amostra biológica revelou resultados promissores, destacando-a como uma alternativa viável e conveniente em comparação com a coleta tradicional de soro. A capacidade de imunodeteção de anticorpos específicos para a LT, avaliada por meio de diferentes antígenos, foi particularmente vantajosa quando a urina foi empregada, indicando um potencial diagnóstico importante para essa abordagem inovadora.

Outro aspecto relevante diz respeito à aplicação de antígenos específicos, como a proteína recombinante eIF5A e seu epítipo, que demonstraram uma notável capacidade de distinguir pacientes infectados de indivíduos saudáveis em regiões endêmicas. A sensibilidade e especificidade alcançaram valores notáveis, especialmente no caso da proteína reIF5A, que atingiu 100% de especificidade e sensibilidade quando a urina foi utilizada como amostra biológica. Esses resultados sugerem um potencial da aplicabilidade desses antígenos, particularmente em conjunto com a urina, como uma estratégia diagnóstica satisfatória.

Além disso, é crucial destacar a necessidade de futuras investigações concentrarem-se em ampliar o escopo amostral para incluir pacientes com diferentes formas de leishmaniose tegumentar, bem como considerar doenças potencialmente de reação cruzada. A consideração de variáveis como hidratação, comorbidades, proteinúria e uso de medicamentos também se mostra essencial para robustecer a compreensão dos resultados e a confiabilidade do diagnóstico baseado em urina.

Por fim, a ELISA baseada em urina emerge como uma ferramenta de diagnóstico alternativa e não invasiva para a leishmaniose tegumentar, proporcionando parâmetros de sensibilidade e especificidade notáveis, especialmente quando empregada a proteína recombinante eIF5A e seu epítipo específico. Estes resultados iniciais sugerem a possível aplicabilidade clínica dessa metodologia, mas salientam a necessidade de pesquisas contínuas para aprimorar e validar sua eficácia em uma variedade de condições clínicas e contextos epidemiológicos.

**CONCLUSÃO**

## **8. CONCLUSÃO**

Os resultados preliminares indicam o potencial antigênico da proteína recombinante relF5A para o diagnóstico da LT usando urina dos pacientes.

***PERSPECTIVAS***

## 9. PERSPECTIVAS

Pretende-se dar continuidade no projeto a fim de:

- Avaliar os antígenos em um painel mais amplo de amostras de urina e soro, incluindo pacientes com leishmaniose tegumentar, leishmaniose visceral, indivíduos saudáveis de regiões endêmicas e não endêmicas, bem como pacientes acometidos por outras doenças infecciosas, como doença de Chagas, hanseníase, tuberculose, esporotricose e malária;
- Incorporar o antígeno de melhor desempenho nos ensaios em tiras imunocromatográficas e avaliar sua eficácia diagnóstica para a leishmaniose tegumentar em condições de campo;
- Publicar os resultados em periódicos internacionais de alto impacto e apresentá-los em congressos científicos, visando à ampla divulgação dos achados.

***REFERÊNCIAS***

## 10. REFERÊNCIAS

1. LEMOHAMMAD, M. M.; FOLEY, T. J.; COHEN, H. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2174–2177, ago. 1993.
2. ALVAR, J. *et al.* The WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One**. v. 7, n. 5, e35671, 2012.
3. ALVES-FERREIRA, E. V.; *et al.* Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal *Leishmania braziliensis* Isolates from the Same Patient. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, e0004018, 2015.
4. ANTONIO L. de F.; *et al.* Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Rev Inst Med trop S Paulo**, v. 56, n. 5, p. 375–80, sep. 2014.
5. ARONSON, N. *et al.* Diagnóstico e tratamento da leishmaniose: diretrizes de prática clínica da Infectious Diseases Society of America (IDSA) e a Sociedade Americana de Medicina Tropical e Higiene (ASTMH). **Am J Trop Med Hyg**, v. 96, n. 1, p. 24–45, 2017.
6. ASFARAM, S. *et al.* Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis - PubMed. **Parasitology international**, v. 67, n. 5, 1 out. 2018.
7. ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasit.**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
8. ATES, H.C. *et al.* Integrated devices for non-invasive diagnostics. **Adv. Funct. Mater.**, v. 31, 2010388, 2021.
9. AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4-15, Oct. 2015.
10. BAILEY, F.; MONDRAGON-SHEM, K.; HOTEZ, P.; RUIZ-POSTIGO, J. A.; AL-SALEM, W.; ACOSTA-SERRANO, Á.; MOLYNEUX, D. H. A new perspective on cutaneous leishmaniasis: Implications for global prevalence and burden of disease estimates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, e0005739, 10 ago. 2017.

11. BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203-211, 2007.
12. BATES PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1097-106, Aug. 2007.
13. BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–106, Aug. 2007.
14. BHATTACHARYYA, A. *et al.* Revealing a novel antigen repressor of differentiation kinase 2 for diagnosis of human visceral leishmaniasis in India. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 120, Jan. 2022.
15. BIENENSTOCK, J.; TOMASI, T. B. Jr. Secretary gamma-A in normal urine. **J Clin Invest**, v. 47, n. 5, p. 1162-71, May 1968.
16. BOYCE, W. H.; GARVEY, F. K.; NORFLEET, C. M. Jr. Proteins and other biocolloids of urine in health and in calculous disease. I. Electrophoretic studies at pH 4.5 and 8.6 of those components soluble in molar sodium chloride. **J Clin Invest**, v. 33, n. 10, p. 1287-97, Oct 1954.
17. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]**, Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
18. BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2022. 2023a.**
19. BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos Confirmados Notificados No Sistema De Informação De Agravos De Notificação - Brasil. 2023b.**
20. BRAZ, L. M. A. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, p. e17, 2019.
21. BURCHMORE, R.J.S.; BARRETT, M.P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **Int J Parasitol**, v. 31, p. 1311–1320, 2001.

22. BURDON, D. W. Immunoglobulins of normal human urine and urethral secretions. **Immunology**, v. 21, n. 2, p. 363–8, Aug 1971.
23. BURDON, D. W. Quantitative studies on urinary immunoglobulins in hospital patients, including patients with urinary tract infection. **Clin Exp Immunol**, v. 6, n. 2, p. 189-96, Feb 1970.
24. BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.
25. CABALLERO, Z. C.; SOUSA, O. E.; MARQUES, W. P.; SAEZ-ALQUEZAR, A.; UMEZAWA, E. S. 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. 1045-9, Aug 2007.
26. CAMERA, P. O. *et al.* Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100, p. 1112–1117, 2006.
27. CATALDO, J. I.; MELLO, F. C.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; GENESTRA, M. S.; *et al.* Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 24, p. 289-94, 2010
28. CDC. Center for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. **Leishmaniasis**. 2023. Acesso em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
29. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Labs**, 2022. Acesso em: [https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html#anchor\\_1590280385631](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html#anchor_1590280385631).
30. CERVANTES-LANDIN, A. Y. *et al.* High molecular weight proteins of *Trypanosoma cruzi* reduce cross-reaction with *Leishmania* spp. in serological diagnosis tests. **BioMed research international**, v. 2014, p. 365403, 2014.
31. CHUNGKANCHANA, N. *et al.* Concentration of Urine Samples Improves Sensitivity in Detection of *Strongyloides*-Specific IgG Antibody in Urine for Diagnosis of Strongyloidiasis. **J Clin Microbiol**, v. 60, n. 1, p. e0145421, Jan 19, 2022.

32. COELHO, E. A. F. et al. Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. **Infection and immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, 2003.
33. COELHO, V. T. et al. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1430, 2012.
34. COSTA, N. et al. The use of bioinformatics tools to improve current Leishmaniasis diagnostic methods: A review. **Authorea**, August 26, 2023.
35. CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 4, p. 142–144, 2000.
36. DANTZLER, W. H. Initial Process in Urine Formation. **Comparative Physiology of the Vertebrate Kidney**. p. 37–80, 2016.
37. DE BRITO, R. C. F. et al. Recent advances and new strategies in Leishmaniasis diagnosis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 8105–8116, 2020.
38. DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell and Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.
39. DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, p. 99–109, 2015.
40. DECRAMER, S. et al. Urine in clinical proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 1850–1862, 2008.
41. DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Stat Q**, v. 45, n. 2-3, p. 267-275, 1992.
42. DUARTE, M. C. et al. Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, 2015.

43. DUARTE, M. C. *et al.* Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 49, n. 4, p. 398–407, 2016.
44. DUTHIE, M. S.; REED, S. G. Not All Antigens Are Created Equally: Progress, Challenges, and Lessons Associated with Developing a Vaccine for Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 7, p. e00108-17, 2017.
45. EAMUDOMKARN, C. *et al.* Diagnostic performance of urinary IgG antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0192598, 2018.
46. EJAZI, S. A. *et al.* Development and Clinical Evaluation of Serum and Urine-Based Lateral Flow Tests for Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1369, 2021.
47. EJAZI, S. A. *et al.* Noninvasive Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Development and Evaluation of Two Urine-Based Immunoassays for Detection of *Leishmania donovani* Infection in India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005035, 2016.
48. ELHAG, S. M. *et al.* Detection of schistosomiasis antibodies in urine patients as a promising diagnostic maker. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 10, p. 773–777, 2011.
49. ELSANA, S. *et al.* HCV antibodies in saliva and urine. **Journal of Medical Virology**, v. 55, n. 1, p. 24–27, 1998.
50. FABER, W. 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.
51. FORATTINI, O. P. *et al.* Nota sobre leishmaniose tegumentar no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista De Saúde Pública*, v. 7, n.4, p. 447–452, 1973.
52. FORSSTRÖM, B. *et al.* Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121673, 2015.
53. FREIRE, M. L. *et al.* Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review. **PLoS One**, v. 16, n. 5, p. e0251956, 2021.

54. GALLUZZI, L. *et al.* Aplicações de PCR em tempo real para diagnóstico de leishmaniose. **Vetores de Parasitas**, v. 11, p. 273, 2018.
55. GARCIA, G. C. *et al.* Development of a chimeric protein based on a proteomic approach for the serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 105, n. 18, p. 6805-6817, Sep. 2021.
56. GHOSH, P. *et al.* Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 383, 2016.
57. GÓMARA, M. J.; HARO, I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 531-546, 2007.
58. 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.
59. GONG, Y.; LI, Q.; YUAN, Y. Accuracy of testing for anti-*Helicobacter pylori* IgG in urine for *H. pylori* infection diagnosis: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open**, v. 7, n. 4, p. e013248, 2017.
60. GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.
61. GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.
62. GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 230–250, 1993.
63. HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.
64. HANSON, L.; TAN, E. Characterization of antibodies in human urine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 44, p. 703–715, 1965.
65. HATAM, G. R. *et al.* Direct Agglutination Test and Enzyme Linked Immunosorbent Assay with Urine Samples for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 2, n. 3, p. 24–28, 2007.
66. HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

67. ISLAM, M. Z. *et al.* Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay using urine samples. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 789-794, 2002.
68. ISLAM, M. Z. *et al.* Direct agglutination test with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 1, p. 78-82, 2004.
69. ISLAM, M. Z. *et al.* ELISA with recombinant rKRP42 antigen using urine samples: a tool for predicting clinical visceral leishmaniasis cases and its outbreak. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 658-662, 2012.
70. ITOH, M. *et al.* Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection in urine samples. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p. 362-365, 2001.
71. ITOH, M. *et al.* Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples: a tool for surveillance of *schistosomiasis japonica*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 34, n. 3, p. 469–472, 2003.
72. JIA, B.; JEON C.O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. **Open Biology**, v. 6, n. 8, p. 160196, 2016.
73. JOSHI, M. S. *et al.* Evaluation of Urine as a Clinical Specimen for Diagnosis of Hepatitis A. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 840–845, 2002.
74. KALTER, D. C. Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis. **Dermatologic Clinics**, v. 12, n. 1, p. 37-50, jan. 1994.
75. KAR, K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.
76. KAUFMAN, D. B.; KATZ, R.; McINTOSH, R. M. Secretory IgA in urinary tract infections. **British Medical Journal**, v. 4, n. 5733, p. 463-465, 1970.
77. KURIYAMA, M. The detection of urinary immunoglobulins with E.L.I.S.A. **Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi**, v. 70, p. 228-234, 1979.
78. LIMA, B. S. *et al.* A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 174-181, 2017.

79. LUDOLF, F., RAMOS, F. F., COELHO, E. A. F. Immunoproteomics and phage display in the context of leishmaniasis complexity. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1112894, 2023.
80. LUDOLF, F. *et al.* Detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine samples: A noninvasive and sensitive way to assay COVID-19 immune conversion. **Science Advances**, v. 8, n. 19, p. eabn7424, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn7424>.
81. MACHADO DE AVILA, R. A. *et al.* Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1640-1646, 2011.
82. MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A. P.; RAICK, A. N. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 253–262, 1986.
83. MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, Dec 2008.
84. MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. 359-375, 1994.
85. MCGARRY, E.; SEHON, A. H.; ROSE, B. The isolation and electrophoretic characterization of the proteins in the urine of normal subjects. **Journal of Clinical Investigation**, v. 34, n. 6, p. 832-844, 1955.
86. MCLENON, J.; ROGERS, M. A. M. The Fear of Needles: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Advanced Nursing**, 2018.
87. MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 32, p. 221-96, 1969.
88. MINEO, J. R. *et al.* **Manual Ilustrado de Práticas Laboratoriais em Imunologia**. Uberlândia: EDUFU, 2016.
89. MONTENEGRO, J. A. A cútis-reação na leishmaniose. **Ann. Fac. Med. Univ.**, São Paulo, v. 1, p. 323:330, 1926.
90. MOREIRA, O. C.; YADON, Z. E.; CUPOLILLO, E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for

- clinical management: Current status and perspectives. **Acta Tropica**, v. 184, p. 29-37, 2018.
91. MUHAMMED, Y. The Best IgG Subclass for the Development of Therapeutic Monoclonal Antibody Drugs and their Commercial Production: A Review. **Immunome Research**, v. 16, n. 1, 2020.
92. NAGAOKA, F. *et al.* Detection of Urinary Antibodies and Its Application in Epidemiological Studies for Parasitic Diseases. **Vaccines**, v. 9, n. 7, p. 778, 2021.
93. NAKAMURA, C.V., SANTOS, A.O., VENDRAMETTO, M.C., *et al.* Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Rev. Bras. Farmacogn.** V.16, n.1, 2006.
94. NEITZKE-ABREU, Herintha Coeto *et al.* Detection of DNA from *Leishmania* (*Viannia*): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e62473, 2013.
95. NOYA, O.; PATARROYO, M.; GUZMAN, F.; DE NOYA, B. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 4, p. 299–308, 2003.
96. OLIVEIRA, Ricardo Andrade *et al.* Renal tubular dysfunction in patients with American cutaneous leishmaniasis. **Kidney International**, v. 80, n. 10, p. 1099-1106, nov. 2011.
97. OPAS. 57º Conselho Diretor. 71º Sessão do Comitê Regional da OMS para as Américas. Resolução CD57.R7, de 01 de outubro de 2019. **Iniciativa da OPAS de Eliminação de Doenças: Política para um enfoque integrado e sustentável visando as doenças transmissíveis nas Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2019.
98. OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas [Internet]**. Número 11, dezembro de 2022. Washington, D.C.: OPS; 2022.
99. PAGNIEZ, Julie *et al.* A systematic review of peptide-based serological tests for the diagnosis of leishmaniasis. **Parasite**, v. 30, p. 10, 2023.
100. PAHO. Pan American Health Organization. **Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas**. Washington, D.C.: PAHO; 2019.

101. PAHO. Pan American Health Organization. **Neglected infectious diseases in the Americas: Success stories and innovation to reach the neediest**. 2016.
102. PERRY, K. R. *et al.* The detection in urine specimens of IgG and IgM antibodies to hepatitis A and hepatitis B core antigens. **Journal of Medical Virology**, v. 38, n. 4, p. 265-270, dez. 1992.
103. PETERS, B. *et al.* The design and implementation of the immune epitope database and analysis resource. **Immunogenetics**, v. 57, n. 5, p. 326–336, 2005.
104. PINHEIRO, A. B. S. *et al.* The accuracy of the Montenegro skin test for leishmaniasis in PCR-negative patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20190433, 2020.
105. PROTPARAM TOOL. **ExPASy Bioinformatics Resource Portal**. Suíça, 2023. Disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>
106. RAJ, S. *et al.* Review on natural products as an alternative to contemporary anti-leishmanial therapeutics. **Journal of Proteins and Proteomics**, v. 11, p. 135–158, 2020.
107. RAMOS, F. F. *et al.* A urine-based ELISA with recombinant non-glycosylated SARS-CoV-2 spike protein for detecting anti-SARS-CoV-2 spike antibodies. **Scientific Reports**, v. 13, p. 4345, 2023.
108. RAMOS, F. F.; PEREIRA, I. A. G.; CARDOSO M. M., *et al.* B-Cell Epitopes-Based Chimeric Protein from SARS-CoV-2 N and S Proteins Is Recognized by Specific Antibodies in Serum and Urine Samples from Patients. **Viruses**, v. 15, n. 9, p. 1877, 2023.
109. REIMÃO, J. Q. *et al.* Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, 2020.
110. REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
111. RODRÍGUEZ LAY, L. de L. *et al.* Anti-hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies in urine samples for rapid diagnosis of outbreaks. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 3, p. 492-494, 2003.
112. ROKSNOER, L. C. *et al.* On the Origin of Urinary Renin: A Translational Approach. **Hypertension**, v. 67, n. 5, p. 927-933, 2016.

113. ROMERO, G. A. *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.
114. ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 251–262, 2014.
115. SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.
116. SAMAD, M. S. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection using urine samples and its application in Bangladesh. **Parasitology International**, v. 62, n. 6, p. 564-567, 2013.
117. SERENO, D. *et al.* Noninvasive Biological Samples to Detect and Diagnose Infections due to Trypanosomatidae Parasites: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1684, 2020.
118. SEVILHA-SANTOS, L. *et al.* Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 2, p. 242-247, 2019.
119. SILVA JUNIOR, G. B. da; BARROS, E. J. G.; DAHER, E. D. F. Kidney involvement in leishmaniasis — a review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 434–440, 2014.
120. SINGH, H.; ANSARI, H. R.; RAGHAVA, G. P. Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62216, 2013.
121. SINGH, S. *et al.* *Leishmania donovani* eukaryotic initiation factor 5A: molecular characterization, localization and homology modelling studies. **Microbial Pathogenesis**, v. 73, p. 37-46, ago. 2014.
122. SOKOLOWSKI, C. J.; GIOVANNITTI, J. A.; BOYNES, S. G. Needle Phobia: Etiology, Adverse Consequences, and Patient Management. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 4, p. 731–744, 2010.

123. SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Detection of anti-Leishmania immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 849–855, 2003.
124. SUN, P. *et al.* Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2013, p. 943636, 2013.
125. SZARGIKI, R.; CASTRO, E. A.; LUZ, E.; KOWALTHUK, W.; MACHADO, A. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-52, fev. 2009.
126. TASLIMI, Y. *et al.* A novel non-invasive diagnostic sampling technique for cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005750, jul. 2017.
127. TASOGLU, S. Toilet-based continuous health monitoring using urine. **Nature Reviews Urology**, v. 19, n. 4, p. 219-230, 2022.
128. TIRELLI, F.; VERNAL, S.; ROSELINO, A. M. Final diagnosis of 86 cases included in differential diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a Brazilian sample: a retrospective cross-sectional study\*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 642–648, 2017.
129. TODOLÍ, F. *et al.* Anti-Leishmania IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 17-23, 2009.
130. TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000 Research**, v. 6, p. 750, 2017.
131. TRIER, N.; HANSEN, P.; HOUEN, G. Peptides, Antibodies, Peptide Antibodies and More. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 6289, 2019.
132. TURNER, M. W.; ROWE, D. S. Antibodies of IgA and IgG class in normal human urine. **Immunology**, v. 12, n. 6, p. 689-699, 1967.
133. VÁZQUEZ, S. *et al.* Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 256-262, 2007.
134. VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

135. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2023a. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1).
136. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Doenças tropicais negligenciadas**. 2023b. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1).
137. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis**: 2023c. Disponível em: [https://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html](https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html)
138. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recognizing neglected tropical diseases through changes on the skin - A training guide for front-line health workers**. Geneva: World Health Organization, 2018.
139. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Geneva. 2020. Acesso em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>
140. WONGPHUTORN, P. *et al.* Diagnostic performance of *Strongyloides*-specific IgG4 detection in urine for diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 298, 2023.
141. ZHANG, X. *et al.* Application of commercial assays to detect IgG antibodies to hepatitis C virus in urine: a pilot study from autopsy cases. **Journal of Medical Virology**, v. 44, n. 2, p. 187-191, 1994.
142. ZHAO, M. *et al.* A comprehensive analysis and annotation of human normal urinary proteome. **Scientific Reports**, v. 7, p. 3024, 2017.