

Análise *in silico* de Catepsina L-like de *Leishmania braziliensis*: busca de um novo alvo para o diagnóstico molecular**Analysis *in silico* of Catepsin L-like of *Leishmania braziliensis*: search for new target for molecular diagnosis**

DOI:10.34117/bjdv6n6-036

Recebimento dos originais: 08/05/2020

Aceitação para publicação: 02/06/2020

David Volfchuk Markus

Formação acadêmica: Graduando em Medicina

Instituição: Universidade Santo Amaro

Endereço: Prof. Eneas de Siqueira Neto, 380, Jardim das Imbuías, São Paulo – SP, Brasil.

E-mail: dmarkus18@gmail.com

Ryan Emiliano da Silva

Formação acadêmica: Mestre em Ciências

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Endereço: Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo – SP, Brasil.

E-mail: ryanemiliano@usp.br

Jaciara de Oliveira Jorge Costa

Formação acadêmica: Mestranda em Ciências

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Endereço: Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo – SP, Brasil.

E-mail: jaciara.jorge@usp.br

Roberta Carvalho de Freitas e Azevedo

Formação acadêmica: Mestre em Medicina e bem estar animal

Instituição: Universidade Santo Amaro

Endereço: Prof. Eneas de Siqueira Neto, 380, Jardim das Imbuías, São Paulo – SP, Brasil.

E-mail: robertacfazevedo@gmail.com

Danilo Ciccone Miguel

Formação acadêmica: Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Endereço: Rua Monteiro Lobato, 255, Barão Geraldo, Campinas – SP, Brasil.

E-mail: dcmiguel@unicamp.br

Arlei Marcili

Formação acadêmica: Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo

Instituição: Universidade Santo Amaro

Endereço: Prof. Eneas de Siqueira Neto, 380, Jardim das Imbuías, São Paulo – SP, Brasil.

E-mail: amarcili@prof.unisa.br

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana é uma importante zoonose causada por diferentes espécies de *Leishmania*, sendo *Leishmania (Viannia) braziliensis* a principal delas. Estes parasitos possuem animais silvestres e domésticos como reservatórios conhecidos. A forma tegumentar de Leishmaniose está difundida no território brasileiro e, apesar de acarretar um prognóstico menos grave do que a forma visceral, é de extrema importância por possuir potencial lesivo às mucosas e à pele, trazendo também uma grande carga emocional, afetando socialmente a vida dos pacientes. Neste estudo, realizamos a análise *in silico* das sequências de catepsina L-like a fim de padronizar um diagnóstico molecular sensível e específico para *L. (V.) braziliensis*. A busca por iniciadores para o diagnóstico molecular específico foi realizada investigando-se características físico-químicas e análise *in silico* da especificidade dos segmentos escolhidos através dos valores de similaridade com bancos de dados (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn)). Os resultados do delineamento *in silico* levaram à escolha dos seguintes iniciadores: CatLeishBF; CatLeishBR; CatLeishBLF; CatLeishBLR e Calbra. A análise *in silico* destes iniciadores demonstrou 100% de similaridade com *L. (V.) braziliensis*, não sendo observada complementaridade com sequências de outras espécies depositadas no banco de dados. Os testes *in vitro*, contudo, não apresentaram ampliações específicas. Novos estudos devem ser conduzidos a fim de aprimorarmos o diagnóstico das leishmanioses tegumentares para medidas terapêuticas mais efetivas e precoce.

Palavras chave: *Leishmania*; *Lutzomyia*; lesões cutâneas; proteases; PCR

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis is an important zoonosis caused by different species of *Leishmania*, including *leishmania (Viannia) braziliensis*. These parasites have wild and domestic animals as known reservoirs. The tegumentary leishmaniasis is widespread in Brazil and, despite causing a less severe prognosis than the visceral form, it is extremely important because it has harmful potential to the mucous membranes and skin, also bringing a great emotional burden, socially affecting the lives of patients. In this study, we performed the analysis *in silico* of cathepsin L-like to standardize a sensitive and specific molecular diagnosis for *L. (V.) braziliensis*. The search for primers for the specific molecular diagnosis was performed *in silico* analysis investigating physicochemical characteristics and specificity segments with values of similarity with databases (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn).) The results of *in silico* led to the choice of the following primers: CatLeishBF; CatLeishBR; CatLeishBLF; CatLeishBLR and Calbra. The *in silico* analysis of these primers demonstrated 100% similarity with *L. (V.) braziliensis*, and no complementarity was observed with sequences of other species deposited in GenBank. The *in vitro* tests, however, did not present specific amplifications. Further studies should be conducted in order to improve the diagnosis of tegumentary leishmaniasis for more effective and early therapeutic measures.

Keywords: *Leishmania*; *Lutzomyia*; skin lesions; proteases; PCR.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* pertence à Família Trypanosomatidae, que compreende protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida (Honibberg, 1963). O gênero *Leishmania* é constituído por cerca de 30 espécies que infectam vertebrados de diferentes ordens (répteis e mamíferos) transmitidas por vários invertebrados hematófagos da Família Psychodidae, distribuídos em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo com exceção da Oceania (Ashford, 2000; Desjeux, 2004).

As leishmanioses são causadas por parasitas deste gênero e constituem um grupo de doenças com grande diversidade epidemiológica e clínica (tegumentares e viscerais). A Leishmaniose Visceral é considerada uma parasitose de caráter, principalmente, zoonótico e uma das mais importantes doenças em Saúde Pública em cerca de 80 países da Ásia, África e América Latina (Ashford et al., 1992). Na América Latina possui ampla distribuição geográfica.

A Leishmaniose tegumentar possui uma distribuição geográfica no Novo e Velho Mundo. No Velho Mundo (sul da Europa, Oriente Médio, partes do sudoeste da Ásia, Ásia Central e África), são descritos como agentes etiológicos: *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*. No Novo Mundo (México e na América Latina), no qual predominam as espécies dos subgêneros de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) venezuelensis* e os subgêneros *Viannia*: *Leishmania (Viannia) peruviana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, sendo que estas duas últimas são responsáveis pela forma mucocutânea da doença (Sundar e Chakravarty, 2015).

A Leishmaniose Tegumentar se manifesta primeiramente como um pequeno eritema, geralmente no local da picada do flebotômico na pele do paciente. Depois, neste mesmo local, desenvolve-se uma pápula dérmica. Classicamente, a lesão tende a tornar-se ulcerada em um período compreendido entre duas semanas a seis meses. Tais lesões são autolimitadas e tendem a um processo de cicatrização espontâneo (Remadi et al., 2016). Isso ocorre em função da relação entre a replicação parasitária e a destruição inflamatória imunomediada do tegumento (Malta-Santos et al., 2017). Esta forma clínica está difundida no território brasileiro e apesar de acarretar um prognóstico menos grave do que a forma visceral, é de extrema importância por possuir potencial lesivo às mucosas e à pele, fazendo com que essa forma da doença possua também uma grande carga emocional, afetando socialmente a vida dos pacientes (Souza et al., 2017). Segundo Ruas et al. (2014), se não tratadas, as lesões mucosas geradas pela Leishmaniose Tegumentar podem deixar sequelas, interferindo em processos de deglutição, respiração e voz (dicção).

As espécies causadoras de Leishmaniose Tegumentar no Brasil são: *Leishmania (V.) braziliensis* que causa lesões cutâneas e mucosas, sendo encontrada em todas as regiões endêmicas do país; *Leishmania (V.) guyanensis*, que causa principalmente lesões cutâneas, ocorrendo

majoritariamente na margem norte do Rio Amazonas; *Leishmania (V.) naiffi*, com ocorrência na Amazônia (Pará e Amazonas); *Leishmania (V.) shawi*, responsável por casos esporádicos no Pará e no Amazonas; *Leishmania (V.) lainsoni*, com casos da doença registrados apenas na Amazônia e *Leishmania (L.) amazonensis*, com diferentes taxas de ocorrência pelo país (Gontijo e Carvalho, 2003). O diagnóstico clínico é complicado pela sintomatologia variada, tornando-o mais complexo (especialmente em regiões não endêmicas) e que podem resultar em confusão com outras patologias (Roiko et al., 2016), como por exemplo a esporotricose (Antonio et al., 2017).

Os quadros infecciosos se justificam pela virulência de seus agentes etiológicos, esta por sua vez é associada a uma série de proteínas com atividade biológica sobre os hospedeiros (Araújo et al., 2013). Dentre elas a Catepsina *L-like*, pertencente ao grupo das cisteíno proteases, sem as quais as formas amastigotas e promastigotas não sobrevivem (Saffari e Mohabatkar, 2009).

Os genes responsáveis por codificar estas enzimas são organizados em famílias multigênicas, o que pode credenciá-los para inferências filogenéticas de sequências bastante próximas (Vargas, 2014). Existem alguns trabalhos descrevendo estes genes e propondo novos testes diagnósticos em espécies do gênero *Trypanosoma* (Cortez et al., 2006; Mendoza-Palomares et al., 2008) e mais recentemente em *L. infantum* (Silva et al., 2019). Contudo, não existem diagnósticos específicos para outras espécies do gênero *Leishmania* baseado nos genes de Catepsina *L-like*. Assim, propõe-se o estudo *in silico* do gene de catepsina *L-like* de *L. (V.) braziliensis* para a padronização de um novo diagnóstico molecular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a busca manual nas regiões consenso dos dados de alinhamento das sequências para identificar regiões-alvos eficientes para o diagnóstico molecular. As características analisadas foram: a proporção de guanina/citosina (GC), formação de grampos de GC, formação de auto homologias, probabilidade de formação de “*Self-Dimer*” mensuradas pelo valor de ΔG , temperatura de *melting* e a análise *in silico* da especificidade dos segmentos escolhidos através dos valores de similaridade com bancos de dados (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)*).

Todas as amostras de DNA utilizadas no estudo foram obtidas através de extração de DNA de promastigotas de fase logarítmica de culturas estabelecidas com o kit comercial Purelink Genomic DNA (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante. As amostras utilizadas nos ensaios foram diluídas a 100 ng/uL. Para garantir a qualidade do DNA foi realizada a amplificação da região V7V8 SSUrDNA (Marcili et al., 2014).

As preparações de DNA amplificados foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%) em tampão TAE a 50V/100mA. Como marcadores de tamanhos moleculares, foram utilizados DNA Ladder Mix (MBI Fermentas®) e Ladder 100bp (MBI Fermentas®). Após a

eletroforese, os géis foram corados com GelRed (Termofisher®) e visualizados em transiluminador de luz U.V.

3 RESULTADOS

Os resultados do delineamento *in silico* levaram à escolha de duas regiões distintas do gene de Catepsina *L-like* com potencial diagnóstico. A primeira região apresenta sequência 5' GTGTGCGCGCCAAGCCCTAGTGCTTCAAGAAA 3' como Iniciador CatLeishBF na fita senso, tendo uma proporção de GC de 56,2% e uma temperatura de *melting* estimada em 68,1°C. Em relação ao Iniciador CatLeishBR na fita anti-senso, foi escolhida a sequência 5' CACGGCTCCGTTCTATTGTTTCAGCAGCCAG 3'. Este oligonucleotídeo apresentou proporção de GC correspondente a 58,1% e temperatura de *melting* presumida em 66,6°C.

A análise *in silico* destes iniciadores demonstrou homologia apenas com sequências gênicas de espécies do complexo *braziliensis* (100% de similaridade com *Leishmania (V.) braziliensis*), não sendo observada complementaridade com sequências de outras espécies depositadas no banco de dados. O tamanho esperado do produto de amplificação foi de 395 pb; para tal se convencionou como condições intrínsecas do CatLeishB-PCR a execução de 34 ciclos de amplificação, os quais dotados individualmente de etapas de desnaturação a 94°C por um minuto, de anelamento a 64°C por um minuto e de extensão da fita a 72°C por 45 segundos.

Foi realizada uma busca manual de sequências alternativas, sendo estas novamente analisadas quanto às suas características cinéticas. Os resultados do delineamento *in silico* levaram à escolha da sequência 5' GCCTGCCACATACATCGCTCGCGCAGGCAC 3' como Iniciador CatLeishBLF na fita senso, tendo uma proporção de GC de 67,7% e uma temperatura de *melting* estimada em 71,6°C. Já em relação ao Iniciador CatLeishBLR na fita anti-senso, foi escolhida a sequência 5' CAAGAACTTCGTGATCCCGAACCGCGCGTGTG 3'. Este oligonucleotídeo apresentou proporção de GC correspondente a 59,4% e uma temperatura de *melting* presumida em 67,69°C. O produto de amplificação esperado correspondeu a 196 pb. A análise *in silico* destes iniciadores também demonstrou homologia apenas com sequências gênicas de espécies do complexo *braziliensis* (100% similaridade com *Leishmania (V.) braziliensis*), não sendo observada complementaridade com sequências de outras espécies depositadas no banco de dados.

Assim, o conjunto de *primers* CatleishBLF e CatleishBLR foi devidamente testado, não apresentando amplificações específicas. Após isso, foi realizada uma combinação entre os *primers* previamente sintetizados e os *primers* para *L. infantum chagasi*, CatLeishF e CatLeishR, que possuem respectivamente as seguintes sequências 5' GACAACGGCACCGTCGGCGCCAAAATAAAAG 3' e 5' CAGTACGGCGGTTTCGCTTGTCTGTTGAAGC 3' (Silva et al., 2019), com a finalidade de se

obter eventual termodinâmica mais eficiente e por similaridade das sequências do primer com a sequência de *L. (V.) braziliensis*, não sendo possível deste modo prever o tamanho dos produtos potencialmente resultantes.

Foram testadas as seguintes combinações de pares de *primers*: CatLeishF + CatLeishBR; CatLeishF + CatLeishBLR; CatLeishR + CatLeishBF e CatLeishR + CatLeishBLF. Todas as combinações foram testadas por gradiente de temperatura e não resultaram em amplificação.

Foi então delineado *in silico* e sintetizado um novo *primer* denominado CaLbra. Os seus parâmetros se caracterizavam pela sequência 5' CAACGCCTGCAGCATCAGGCCGCGTTGCA 3', uma proporção de GC de 66,7% e temperatura de *melting* estimada em 72,4°C. Tal *primer* foi utilizado como fita anti-senso, em conjunto com o *primer* CatLeishBLF (fita senso), anteriormente sintetizado. O produto esperado para tal reação era de 300 pb. Os resultados foram ampliações inespecíficas. Esse mesmo par de *primer* (CaLbra + CatLeishBLF) foi testado para *L. infantum chagasi*, não amplificando nenhum produto tal como era esperado. O gradiente de temperatura (CaLbra + CatLeishBLF) foi repetido, mas não resultou em amplificação de DNA.

4 DISCUSSÃO

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença de caráter crônico e desfigurante (Montenegro, 1926), que pode ser confundida com inúmeras outras dermatopatias, como a hanseníase, esporotricose e tuberculose (Antonio et al., 2017) e tem no seu diagnóstico rápido e preciso um grande desafio (Gontijo e Carvalho, 2003). Esta forma clínica tem a característica de em alguns casos ser auto-limitante, deixando apenas nos afetados cicatrizes que muitas vezes podem levar a inúmeros problemas de desfiguração que culminam em danos psicológicos e problemas de autoestima (Gontijo e Carvalho, 2003).

Na Leishmaniose Visceral, hoje, há uma série de ferramentas diagnósticas, desde testes sorológicos até moleculares, baseados em inúmeros marcadores ou genes com diferenças relacionadas a sensibilidade e especificidade dos ensaios (Aronson, et al., 2016, Silva et al., 2019). Entretanto, o mesmo não ocorre para a Leishmaniose tegumentar, onde o diagnóstico é, majoritariamente, clínico ou através de testes de hipersensibilidade tardia (Intradermorreação de Montenegro - IDRM) (Brasil, 2017).

O diagnóstico rápido e preciso dessa patologia é algo primordial para a adoção de medidas terapêuticas. Não existe ainda um método que possa ser adotado como padrão ouro para o diagnóstico da Leishmaniose tegumentar, sendo necessária a combinação de várias técnicas (Faber et al., 2003, Mendes et al., 2019). O manual de vigilância de Leishmaniose Tegumentar do Ministério da Saúde (MS) do Brasil (Brasil, 2017) preconiza o diagnóstico clínico, levando em conta o aspecto lesional e confirmação através da IDRM. Somente nos casos onde há alguma falha nesses testes se

indica os métodos parasitológicos, como a pesquisa de formas amastigotas, cultivo ou diagnóstico molecular, mas realizados em centros referenciados pelo ministério da Saúde (Brasil, 2017).

Os testes sorológicos como o IFI, ELISA e *Western Blot* não são recomendados, pois apesar de inúmeros trabalhos demonstrarem sua aplicação (Skraba et al., 2014; Mendes et al., 2019; Link et al., 2017), apresentam reações cruzadas com outras doenças, como a Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral (Szargiki et al., 2009; Faber et al., 2003; Lima et al., 2017).

Na Leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania (V.) braziliensis*, a carga parasitária nas lesões é baixa, mesmo em ulcerações antigas e com destruição tecidual dificultando o diagnóstico parasitológico. Entretanto, ocorre uma exacerbação nas reações ao teste IDRMM facilitando este tipo de diagnóstico (Moreira et al., 2017). Quanto ao diagnóstico molecular para esta espécie, um estudo demonstrou que o marcador baseado no gene de Mini-exon (*Spliced leader*) mostrou alta sensibilidade e especificidade para o complexo *L. (V.) braziliensis* (Gomes et al., 2008), ao passo que ensaios específicos para *L. (V.) braziliensis* baseados em genes presentes no cinetoplasto (kDNA) demonstraram baixa sensibilidade (Marcussi et al., 2013).

Os genes de catepsina já mostraram excelentes resultados no diagnóstico de diferentes espécies de *Trypanosoma*, dentre elas *T. vixax* (Cortez et al., 2009), *T. congolense* (Mendonza-Palomares et al., 2008), *T. theileri* (Rodrigues et al., 2010), *T. cruzi* (Lima et al., 2012) e *T. rangeli* (Ortiz et al., 2009) e para *Leishmania (L.) infantum* (Silva et al., 2019).

Apesar de, *in silico*, as sequências avaliadas terem apresentado características consideradas ideais na definição de um novo *primer*, não houve nenhuma amplificação quando feito o teste *in vitro* com as amostras de DNA do parasita em nosso estudo. Tal resultado não deve ser ignorado, pois quando comparado com outras pesquisas, demonstra que *L. (V.) braziliensis* tem maior dificuldade de ter seu diagnóstico preciso do que as outras espécies de *Leishmania* (Gomes et al., 2008; Marcussi et al., 2008).

Desse modo, podemos dizer que até o presente momento não há nenhum *primer* com capacidade de prover um diagnóstico preciso da Leishmaniose tegumentar causada pela *L. (V.) braziliensis*, com boas sensibilidade e especificidade, a semelhança do que ocorre com a *L. (L.) infantum* Novo Mundo, por exemplo (Silva et al., 2019).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (Processo FAPESP 2017/23631-7).

REFERÊNCIAS

ANTONIO LF, PIMENTEL MI, LYRA MR, MADEIRA MF, MIRANDA LF, PAES RA, BRITO-SANTOS F, CARVALHO MH, SCHUBACH AO. *Sporothrix schenckii* Sensu Lato identification in fragments of skin lesion cultured in NNN medium for differential diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 87, p. 118-120, 2017.

ARAÚJO VEM, PINHEIRO LC, ALMEIDA MCM, MENEZES FC, MORAIS MHF, REIS IA, ASSUNÇÃO RM, CARNEIRO M. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: A spatial analysis in urban área. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 5, 2013.

ARONSON N, HERWALDT BL, LIBMAN M, PEARSON R, LOPEZ-VELEZ R, WEINA P, CARVALHO EM, EPHROS M, JERONIMO S, MAGILL A. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis*, v. 63, p. 202-264, 2016.

ASHFORD RW, SEAMAN J, SCHORSCHER J, PRATLONG F. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: identity and systematic position of the parasites from patients and vectors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 86, p 379-380, 1992.

ASHFORD RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

BRASIL, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Ministério da Saúde, v. 1, p. 1-191, 2017.

CORTEZ AP, VENTURA RM, RODRIGUES AC, BATISTA JS, PAIVA F, AÑEZ N, MACHADO RZ, GIBSON WC, TEIXEIRA MM. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*, v. 133, p. 159-169, 2006.

CORTEZ AP, RODRIGUES AC, GARCIA HA, NEVES L, BATISTA JS, BENGALY Z, PAIVA F, TEIXEIRA MM. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America characterization, relationships and diagnostic implications. *Mol Cell Probes*, v. 23, p. 44-51, 2009.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 28, p. 305-318, 2004.

FABER WR, OSKAM L, VAN GOOL T, KROON NC, KNEGT-JUNK KJ, HOFWEGEN H, VAN DER WAL AC, KAGER PA. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, v. 49, p. 70-74, 2003.

GOMES AH, ARMELIN IM, MENON SZ, PEREIRA-CHIOCCOLA VL. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*, v. 119, p. 319-324, 2008.

GONTIJO B, CARVALHO MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop, v. 36, p. 71-80, 2003.

HONIGBERG BM. 1963. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J, editors. Progress in Protozoology, p. 68, 1963.

LIMA L, ORTIZ PA, SILVA FM, ALVES JM, SERRANO MG, CORTEZ AP, ALFIERI SC, BUCK GA, TEIXEIRA MM. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. PLoS One, v. 7, 2012.

LIMA JT, GENNARI SM, SOARES HS, MINERVINO AH, MALHEIROS AF, MARQUES FS, LAURENTI MD, MACHADO RZ, MARCILI A, LABRUNA MB, SOARES RM. Serodiagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in Indigenous Reserves in the Brazilian Amazon Region. Rev Soc Bras Med Trop, v. 50, p. 61-66, 2017.

LINK JS, ALBAN SM, SOCCOL CR, PEREIRA GV, THOMAZ SOCCOL V. Synthetic Peptides as Potential Antigens for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis. J Immunol Res, 2017.

MALTA-SANTOS H, ANDRADE BB, ZANETTE DL, COSTA JM, BOZZA PT, BANDEIRA-MELO C, BARRAL A, FRANÇA-COSTA J, BORGES VM. Resolvin D1 drives establishment of *Leishmania amazonensis* infection. Sci Rep, v. 7, 2017.

MARCILI A, SPERANÇA MA, COSTA AP, MADEIRA MF, SOARES HS, SANCHES COCC, ACOSTA ICL, GIROTTO A, MINERVINO AHH, HORTA MC, SHAW JJ, GENNARI SM. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. Infect Genet Evol, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARCUSSI VM, MARCUSSI LM, BARBOSA-TESSMANN IP, LONARDONI MVC, SILVEIRA TGV. *Leishmania (Viannia) Braziliensis*: New Primers for Identification Using Polymerase Chain Reaction. Exp Parasitol, v. 4, p. 300-305, 2008.

MARCUSSI LM, SKRABA CM, PERLES TF, PEDROSO RB, LONARDONI MVC, SILVEIRA TGV. Evaluation of Specific Primers for Species Identification of *Leishmania (V.) braziliensis*. J Trop Pathology, v. 42, 2013.

MENDES APO, OLIVEIRA BC, PEREIRA AMS, CASTRO MCAB, SOUZA MA, BRITO MEF, ARAÚJO FF, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, PEREIRA VRA. American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L. (V.) braziliensis* fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. BMC Infect Dis, v. 19, 2019.

MENDOZA-PALOMARES C, BITEAU N, GIROUD C, COUSTOU V, COETZER T, AUTHIÉ E, BOULANGÉ A, BALTZ T. Molecular and Biochemical Characterization of a Cathepsin B-like Protease Family Unique to *Trypanosoma Congolense*. Eukaryot Cell, v. 7, p. 684-697, 2008.

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

MOREIRA RB, PIRMEZ C, OLIVEIRA-NETO MP, AGUIAR LS, GONÇALVES AJS, PEREIRA LOR, ABREU L, OLIVEIRA MP. AIM2 Inflammasome Is Associated With Disease Severity in Tegumentary Leishmaniasis Caused by *Leishmania (V.) Braziliensis*. Parasite Immunol, v. 39, 2017.

ORTIZ PA, MAIA DA SILVA F, CORTEZ AP, LIMA L, CAMPANER M, PRAL EM, ALFIERI SC, TEIXEIRA MM. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. Acta Trop, v. 112, p. 249-259, 2009.

REMADI L, HAOUAS N, CHAARA D, SLAMA D, CHARGUI N, DABGHI R, JBENIANI H, MEZHOUD H, BABBA H. Clinical Presentation of Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania major*. Dermatology, v. 232, p. 752-759, 2016.

RODRIGUES AC, GARCIA HA, ORTIZ PA, CORTEZ AP, MARTINKOVIC F, PAIVA F, BATISTA JS, MINERVINO AH, CAMPANER M, PRAL EM, ALFIERI SC, TEIXEIRA MM. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. Parasitol Int, v. 59, p. 318-325, 2010.

ROIKO MS, SCHMITT BH, RELICH RF, MEYER TL, ZHANG S, DAVIS TE. An unusual presentation of leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-positive individual. JMM Case Rep, v. 5, 2016.

RUAS AC, LUCENA MM, COSTA AD, VIEIRA JR, ARAÚJO-MELO MH, TERCEIRO BR, SOUSA TTS, OLIVEIRA SCHUBACH A, VALETE-ROSALINO CM. Voice disorders in mucosal leishmaniasis. PLoS One, v. 9, 2014.

SAFFARI B, MOHABATKAR H. Computational Analysis of Cysteine Proteases (Clan CA, Family C1) of *Leishmania major* to Find Potential Epitopic Regions. Genom Proteom Bioinf, v. 7, p. 87-95, 2009.

SILVA RE, SAMPAIO BM, TONHOSOLO R, COSTA APR, SILVA COSTA LE, NIERI-BASTOS FA, SPERANÇA MA, MARCILI A. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. BMC Infect Dis, v. 19, 2019.

SKRABA CM, PEDROSOA RB, FIORINI .A, ROSADO FR, ARISTIDES SMA, LONARDONI MVC, TEIXEIRA JJV, SILVEIRA TGV. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Diagn Micr Infec Dis, v. 78, p. 411-417, 2014.

SOUZA RM, ANDRADE HF JUNIOR, DUARTE MI, BRAZ LM, SCHUBACH AO, SILVA FC, AMATO VS. Reactivation of cutaneous and mucocutaneous tegumentary leishmaniasis in rheumatoid arthritis patients: an emerging problem? Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 59, 2017.

SUNDAR S, CHAKRAVARTY J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*, v. 16, p. 237-252, 2015.

SZARGIKI R, CASTRO EA, LUZ E, KOWALTHUK W, MACHADO ÂM, THOMAZSOCCOL V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis*, v. 13, p. 47-52, 2009.

VARGAS P. Genes de cisteíno-proteases de *Trypanosoma* spp. de mamíferos: polimorfismo e relações filogenéticas. 2014. 171 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia da Relação Patógeno-hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.