

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

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA AMASTINA
DE *Leishmania* SOB A FORMA
RECOMBINANTE E DE EPITOPO
ESPECÍFICO DE CÉLULAS B PARA O
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO
DIFERENCIAL DA LEISHMANIOSE
VISCERAL**

DANNIELE LUCIANA VALE

BELO HORIZONTE

2019

V149a Vale, Danniele Luciana.
Avaliação da Proteína Amastina de Leishmania sob a forma recombinante e de Epitopo específico de Células B para o diagnóstico sorológico diferencial da Leishmaniose Visceral [manuscrito]. / Danniele Luciana Vale. - - Belo Horizonte: 2019.
65f.: il.
Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho.
Coorientador (a): Vivian Tamiatti Martins; Daniel Silva Dias.
Área de concentração: Ciências da saúde.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Proteínas Recombinantes. 2. Peptídeos. 3. Testes Sorológicos. 4. Leishmaniose Visceral. 5. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Martins, Vivian Tamiatti. III. Dias, Daniel Silva. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QU 55

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

DANNIELE LUCIANA VALE

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA AMASTINA
DE *Leishmania* SOB A FORMA RECOMBINANTE E
DE EPITOPO ESPECÍFICO DE CÉLULAS B PARA O
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DIFERENCIAL DA
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestra pelo referido Programa.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Co-Orientadores: Dra. Vivian Tamietti Martins – UFMG.
Dr. Daniel Silva Dias – UFMG.

BELO HORIZONTE

2019



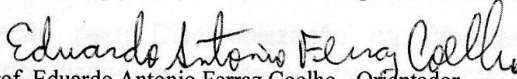
FOLHA DE APROVAÇÃO

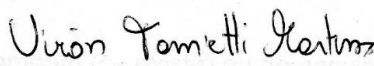
"Avaliação da proteína amastina de Leishmania sob a forma recombinante e de epitopo específico de células B para o diagnóstico sorológico diferencial da leishmaniose visceral"


DANNIELE LUCIANA VALE

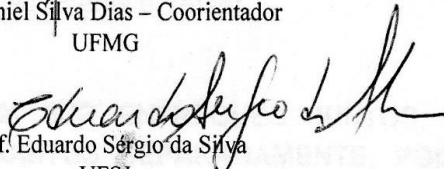
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

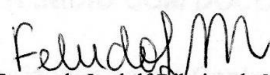
Aprovada em 02 de agosto de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Orientador
UFMG


Dra. Vivian Tamietti Martins - Coorientadora
UFMG


Dr. Daniel Silva Dias - Coorientador
UFMG


Prof. Eduardo Sérgio da Silva
UFSJ


Dra. Fernanda Ludolf Ribeiro de Melo
UFMG

Belo Horizonte, 2 de agosto de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca me desamparar e me dar forças a todo momento para seguir em frente.

À todos os meus familiares, em especial ao meu pai José Geraldo e minha mãe Edelweiss, pelo apoio e compreensão durante todos esses anos dedicados à vida acadêmica.

Agradeço aos meus irmãos Ana Luiza e Wellerson por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Aos meus amigos, pelos ânimos e incentivos. Àqueles que de longe ou perto tentam sempre me apoiar, em especial ao Thales, ao Alexandre, ao Abel, à Larissa e à Nádia. Aos amigos do laboratório que me ajudaram nessa jornada, em especial Tauane e Guilherme.

Agradeço aos coorientadores da minha dissertação, Dra. Vivian Tamietti Martins e Dr. Daniel Silva Dias, pelos conhecimentos passados na realização do trabalho e também à banca pela disponibilidade na avaliação do mesmo.

À UFMG, por permitir essa conquista.

À todos os professores que passaram pelo meu caminho e foram extremamente importantes na minha formação. Em especial ao meu orientador Eduardo Antonio Ferraz Coelho, por toda compreensão, ajuda, disponibilidade, compromisso, sinceridade, exemplo e apoio para realização desse estudo. Não há palavras para o meu agradecimento e carinho.

Por fim, à todos que participaram direta ou indiretamente da minha formação, fica aqui o meu sincero agradecimento.

“...A batalha mais difícil de ser travada ocorre no teu mundo íntimo. Ninguém a vê, a aplaude ou a censura. É tua. Vitória, ou derrota, pertencerá a ti em silêncio. Nenhuma ajuda exterior poderá contribuir para o teu sucesso, ou conjuntura alguma te levará ao fracasso...”
(Lancellin)

RESUMO

O diagnóstico da leishmaniose visceral (LV) apresenta problemas devido à toxicidade e / ou alto custo dos medicamentos. Além disso, não existe vacina para proteger contra doenças humanas. Neste estudo, a antigenicidade e a imunogenicidade da proteína amastina foram avaliadas em cães e humanos infectados por *L. infantum*. Para o diagnóstico, além da proteína recombinante, 1 epítipo linear de célula B foi sintetizado e avaliado em ensaios sorológicos. Os resultados mostraram alta sensibilidade e especificidade para detectar a doença quando ambos os antígenos foram empregados contra um painel sorológico canino e humano. Em contraste, quando se utiliza rA2 e uma preparação antigênica de *Leishmania* solúvel, os valores de sensibilidade e especificidade mostraram-se mais baixos. Um estudo preliminar de imunogenicidade mostrou que a proteína amastina induziu alta produção de IFN- γ e baixa IL-10 em PBMC estimuladas derivadas de pacientes com VL tratados e indivíduos saudáveis, sugerindo um uso potencial dessa proteína como um imunógeno para proteger contra doenças humanas.

Palavras-chave: Amastina; proteínas recombinantes; peptídeos; sorodiagnóstico; leishmaniose visceral; imunogenicidade.

ABSTRACT

The diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) presents problems due to the toxicity and/or high cost of drugs. In addition, no vaccine exists to protect against human disease. In this study, the antigenicity and immunogenicity of amastin protein were evaluated in *L. infantum*-infected dogs and humans. For the diagnosis, besides the recombinant protein, 1 linear B-cell epitope was synthesized and evaluated in serological assays. Results showed high sensitivity and specificity values to detect the disease when both antigens were employed against a canine and human serological panel. By contrast, when using rA2 and a soluble *Leishmania* antigenic preparation, sensitivity and specificity values proved to be lower. A preliminary immunogenicity study showed that the amastin protein induced high IFN- γ and low IL-10 production in stimulated PBMC derived from treated VL patients and healthy subjects, thus suggesting a potential use of this protein as an immunogen to protect against human disease.

Keywords: Amastin; recombinant proteins; peptides; serodiagnosis; visceral leishmaniasis; immunogenicity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AUC** - Acurácia do teste
- DAT** - Teste de aglutinação direta
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- DO** - Densidade ótica
- DSe%** - Percentual de sensibilidade diagnóstica
- DSp%** - Percentual de especificidade diagnóstica
- DPP®** - Dual-Path Platform
- EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA** - Teste de imunoadsorção enzimática
- IC** - Intervalo de confiança
- ICT** - Teste imunocromatográfico
- IDRM** - Intradermoreação de Montenegro
- IFAT** - Teste de imunofluorescência indireta
- IFN** - Interferon
- IgG** - Imunoglobulina G
- IL** - Interleucina
- IPTG** - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo
- KDa** - kilodalton
- LC** - Leishmaniose cutânea
- LCD** - Leishmaniose cutâneo-difusa
- LCL** - Leishmaniose cutâneo-localizada
- LM** - Leishmaniose muco-cutânea
- LR** - Razão de verossimilhança
- LT** - Leishmaniose tegumentar
- LV** - Leishmaniose visceral
- LVC** - Leishmaniose visceral canina
- LVH** - Leishmaniose visceral humana
- n** - Número amostral
- NAGE** - Núcleo de Análise de Genoma
- ODP** - Orto-fenilodiamina
- pb** - Pares de bases
- PBS** - Solução salina tamponada com fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase
PKDL - Leishmaniose tegumentar pós kalazar
PSA - Persulfato de amônio
rAmastina - Proteína Recombinante Amastina
ROC - Característica de operação do receptor
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida desnaturante
SFB - Soro fetal bovino
SLA - Extrato antigênico solúvel de *Leishmania spp.*
TAE - Tampão Tris-HCl/Ácido acético/EDTA
TBE - Tampão Tris-HCl/Ácido Bórico/EDTA
TE - Tampão Tris-EDTA
TEMED - N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina
TI - Tampão de incubação
TNF - Fator de necrose tumoral
VPN - Valor preditivo negativo
VPP - Valor preditivo positivo
UV - Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp.</i> | 06 |
| Figura 2. Sequência de aminoácidos da proteína amastina..... | 14 |

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O tema escolhido para a dissertação foi devido à elevada incidência das leishmanioses no mundo, e apesar da mesma ter um alcance global, ainda hoje é considerada uma doença negligenciada. Com isso, são necessários estudos que visam mudar esse perfil, estimulando o investimento em recursos que viabilizem um diagnóstico precoce, um tratamento adequado, bem como medidas de prevenção contra a doença.

Em virtude da possibilidade de ocorrerem falhas nos testes diagnósticos, podem acontecer casos de animais infectados não serem detectados, vivendo em meio à sociedade como reservatórios do parasito e, conseqüentemente, aumentando as chances de disseminação da doença para o homem através do inseto vetor. Além disso, deve-se considerar a gravidade da doença e a toxicidade dos tratamentos utilizados em casos humanos, o que resulta em um fator que justifica a importância de um diagnóstico correto. Desse modo, a detecção dos casos positivos com elevada sensibilidade e especificidade é de extrema necessidade, a fim de aumentar a confiabilidade dos testes, bem como, minimizar os custos do mesmo, beneficiando os pacientes e também os sistemas de saúde.

Outro motivo que justifica a escolha desse tema foi o fato de ter feito iniciação científica durante a graduação, onde pude conhecer o trabalho realizado pelo professor Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, que se dedica ao estudo das leishmanioses, e cujo assunto me despertou interesse.

Sendo assim, este trabalho foca na obtenção de uma proteína recombinante e um de seus epítomos específicos de células B, derivada de *Leishmania infantum*, e sua aplicação para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana. A apresentação deste documento foi realizada de acordo com a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013, que regulamenta o formato dos trabalhos finais e estabelece condições para a marcação da defesa de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da UFMG.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1. Epidemiologia da leishmaniose visceral..... | 3 |
| 2.2. Etiologia e ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp</i> | 4 |
| 2.3. Manifestações clínicas das leishmanioses..... | 6 |
| 2.4. Diagnóstico da leishmaniose visceral humana..... | 8 |
| 2.5. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina..... | 11 |
| 2.6. Proteína Amastina..... | 14 |
| 3. OBJETIVOS | 16 |
| 3.1. Objetivos geral..... | 16 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 16 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 17 |
| 4.1. Amostras de soro canino..... | 17 |
| 4.2. Amostras de soro humano..... | 17 |
| 4.3. Mapeamento de epítomos específicos de célula B da amastina..... | 18 |
| 4.4. Antígenos utilizados para os ensaios de ELISA..... | 18 |
| 4.4.1 Preparo de extrato protéico solúvel de <i>Leishmania infantum</i> (SLA)..... | 18 |
| 4.4.2 Clonagem e expressão das proteínas rAmastina e A2..... | 19 |
| 4.4.2.1 Extração do DNA genômico dos parasitos..... | 19 |
| 4.4.2.2 Amplificação e clonagem das sequências gênicas por PCR..... | 20 |
| 4.4.2.3 Sequenciamento dos genes..... | 20 |
| 4.4.2.4 Expressão e purificação das proteínas recombinantes..... | 20 |
| 4.5 Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%..... | 21 |
| 4.6 ELISA para o sorodiagnóstico da LV..... | 22 |
| 4.7 Análise estatística..... | 22 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 6. CONCLUSÃO | 51 |
| 7. PERSPECTIVAS | 52 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |
| 9. ANEXOS | 64 |

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses se constituem por um conjunto de doenças infecciosas e parasitárias, que são ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e cuja transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo por fêmeas de vetores dos gêneros *Phlebotomos* e *Lutzomyia*, em países do Velho Mundo e nas Américas, respectivamente (WHO, 2019). A manutenção e a circulação das diferentes espécies de *Leishmania* na natureza ocorrem principalmente em ambiente silvestre, contudo, pode-se observar uma maior incidência da enfermidade em áreas urbanas e periurbanas (WHO, 2010).

A forma mais grave da doença é a leishmaniose visceral (LV), que pode ocasionar o óbito de aproximadamente vinte mil pessoas por ano (WHO, 2017). Na América, a principal espécie causadora da LV é a *Leishmania infantum*, enquanto que a espécie prevalente no hemisfério oriental é a *Leishmania donovani* (Griesven e Diro, 2019).

Nas áreas urbanas endêmicas, os cães são considerados importantes hospedeiros do parasito, atuando como reservatório e sendo apontados como potenciais fontes de infecção, fazendo-se necessária a adoção de medidas de controle da LVC com vista na redução da disseminação da doença (Dantas-Torres, 2007).

O diagnóstico precoce da LV facilita a elaboração de um tratamento mais adequado contra a doença, aumentando a chance de cura de vários pacientes, assim como diminuindo a possibilidade de disseminação da doença (Coelho *et al.*, 2009). O método de diagnóstico parasitológico convencional, baseado na visualização direta do parasito via microscopia, apesar de ser utilizado para comprovar a LV, demonstra uma variação na sensibilidade (Griensven e Diro, 2019). Uma melhor opção para detectar a doença são os testes sorológicos, que possuem bom custo-benefício e, especialmente, porque envolvem métodos que são menos invasivos nas coletas das amostras que serão avaliadas (Coelho *et al.*, 2016).

Atualmente, existe um kit comercial, Kalazar Detect™, que é um método imunocromatográfico baseado na proteína recombinante k39, onde se detecta anticorpos específicos contra essa proteína em soros de pacientes com LV (Sundar e Rai, 2002; Boelaert *et al.* 2007). Outro teste semelhante tem sido empregado para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), o Dual Path Platform - DPP®, que

detecta anticorpos contra as proteínas rk26 e rk39 (Pinto *et al.*, 2016). Contudo, esses testes ainda apresentam problemas em relação à especificidade e sensibilidade quando utilizadas diferentes classes de soros, podendo gerar resultados falso-negativos em indivíduos com LV recém-infectados ou nos imunossuprimidos, bem como resultados falso-positivos em indivíduos com doenças correlacionadas à LV ou que vivem em áreas endêmicas da doença (Cunningham *et al.*, 2009; Horst *et al.*, 2012; Grimaldi *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2013).

Novos progressos em genômica, proteômica e bioinformática estão resultando em estratégias inovadoras para identificar marcadores antigênicos para as doenças (Costa *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2015). Em trabalhos recentes, a proteína amastina foi identificada em formas amastigotas de *L.infantum* por anticorpos presentes em soros de cães com LV sintomáticos e assintomáticos, além de ser conservada em diferentes espécies do parasito *Leishmania spp.*, o que levou a crer que esta proteína poderia ser um alvo diagnóstico interessante a ser estudado (Jackson, 2010; Coelho *et al.*, 2012).

Nesta pesquisa, a porcentagem de sensibilidade e especificidade utilizando a proteína recombinante amastina (rAmastina) e um epítipo específico de célula B derivado da amastina, foram investigados em amostras de soros humanos e caninos, por meio do método de ELISA, e os resultados mostraram que a detecção de anticorpos específicos à proteína pode vir a melhorar o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral nesses hospedeiros mamíferos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias negligenciadas que representam um grande problema de saúde pública e acometem principalmente países que apresentam baixas taxas de desenvolvimento socioeconômico. Calcula-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas estejam expostas aos riscos de infecção (Croft *et al.*, 2003; WHO, 2017).

Dentre os casos anuais de leishmaniose, estima-se que haja uma incidência aproximada de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos correspondentes à leishmaniose visceral, sendo que nas Américas, estima-se que o Brasil seja responsável por 96% dos casos, o que faz com que a doença seja considerada um importante problema de Saúde Pública (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2019). Dentre os casos globais, estima-se que 90% acometem principalmente países como Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia, no entanto, os dados associados à mortalidade são baixos, visto que somente as mortes hospitalares estão demonstradas (Alvar *et al.*, 2012).

Em relação à LV zoonótica, os cães constituem os principais reservatórios urbanos para *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral canina (LVC), além de desempenharem um papel fundamental no ciclo de transmissão a outros seres vivos (Sevá *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2018). Vale ressaltar que na América do Sul existem milhões de cães que estão infectados, sendo que, principalmente no Brasil e na Venezuela, essa taxa de infecção é consideravelmente mais elevada (Baneth *et al.*, 2008). Diante disso, a LVC requer uma atenção especial pelas autoridades competentes, principalmente por apresentar uma maior taxa de prevalência em relação à doença humana e por haver uma associação direta entre o número de cães infectados e o aumento da incidência da doença em seres humanos, sugerindo um maior risco para os indivíduos (Duprey, *et al.*, 2006).

Adicionalmente aos motivos citados, também se deve levar em consideração a existência de muitos animais assintomáticos residentes em áreas endêmicas da doença, os quais podem potencializar a transmissão dos parasitos, através do inseto vetor, a novos hospedeiros (Marzochi *et al.*, 1985; Duprey, *et al.*, 2006). Ressalta-se que essa disseminação da doença é propiciada também pela migração de cães infectados para áreas não endêmicas, assim como a migração de cães saudáveis

para áreas endêmicas da doença, o que facilita a continuação do ciclo do parasito (Arias *et al.*, 1996). Além disso, também há outros fatores facilitadores, como o cambio climático, que em certos momentos pode favorecer a aparição do vetor de transmissão da doença (Adegboye *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2016).

2.2 Etiologia e ciclo biológico do parasito *Leishmania ssp.*

As leishmanioses são doenças vetoriais causadas por parasitos protozoários, os quais pertencem ao Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem kinetoplastida, Família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania*. O vetor transmissor é um inseto da Ordem Diptera, Família *Psychodidae*, Sub-Família Phlebotominae, pertencente aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, em países do Velho Mundo e nas Américas, respectivamente. Ressalta-se que apenas as fêmeas possuem hábitos hematófagos, sendo capazes de disseminar a doença, enquanto que, diferentemente, os machos são fitófagos (Grimaldi e Tesh, 1993).

Os parasitos *Leishmania spp.* são heteroxênicos, sendo que alternam os estágios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados. Dentre os hospedeiros mamíferos, encontra-se uma ampla variedade de espécies, como cães domésticos, gatos e coelhos, além de animais silvestres, como raposas e marsupiais (Quinnell e Courtenay, 2009; Roque e Jansen, 2014).

Os parasitos ainda possuem ciclo de vida dimórfico, se apresentando sob duas formas morfológicas principais: amastigotas e promastigotas. As formas promastigotas, as quais são identificadas no vetor transmissor da doença, caracterizam-se por terem formato alongado, delgado e possuem um único flagelo, que é o responsável por lhes conferir motilidade. Ademais, possuem um cinetoplasto que se localiza entre a porção anterior e o núcleo (Sacks e Kamhawi, 2001; Sacks e Sher, 2002).

Quanto às formas amastigotas, são arredondadas, detêm um flagelo rudimentar, e um cinetoplasto em formato de bastão, sendo que a multiplicação ocorre nos vacúolos parasitóforos, no interior do sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos (Sacks e Kamhawi, 2001; Sacks e Sher, 2002).

Um fator importante na epidemiologia dessa enfermidade são os insetos vetores. A fêmea do flebotomíneo necessita de sangue para ovulação e desenvolvimento de ovos, sendo assim, ao realizar o repasto sanguíneo em

mamíferos infectados, pode ocorrer a transmissão do parasito do hospedeiro mamífero para o inseto vetor, sendo que estes parasitos podem se encontrar em formas amastigotas livres no sangue ou dentro de células fagocíticas infectadas (Pessoa e Martins, 1988; Medeiros *et al.*, 2005; Bates, 2007).

Essas células, ao alcançarem o intestino do flebotomíneo, vão romper-se e liberar os parasitos, que seguidamente transformam-se nas formas promastigotas procíclicas e então migram para o trato digestório médio e anterior do flebotomo, onde passam por um processo de multiplicação e diferenciação em promastigotas metacíclicas. Esta forma infectiva do parasito coloniza as glândulas salivares do vetor tornando-o apto a infectar um novo hospedeiro mamífero (Pessoa e Martins, 1988; Medeiros *et al.*, 2005).

Quando o vetor infectado realiza um novo repasto sanguíneo, o mesmo pode regurgitar as formas promastigotas metacíclicas, que serão veiculadas juntamente com a saliva, na derme do hospedeiro mamífero. Prontamente, neutrófilos, monócitos e macrófagos, migram para o local da infecção, quando irão fagocitar as formas promastigotas dos parasitos, e uma vez dentro dos fagolisossomos, se diferenciam em formas amastigotas. (Kaye e Scott, 2011; Ribeiro-Gomes e Sacks, 2012; Handler *et al.*, 2015).

As amastigotas passam então a replicar através de divisão binária até que ocorra a lise celular e, portanto, a liberação dessas formas no hospedeiro. Desse modo, os parasitos que foram liberados podem ser fagocitados por outras células e dar seguimento à disseminação no hospedeiro mamífero ou podem ser novamente ingeridos por outros vetores, concluindo o ciclo biológico do parasito *Leishmania spp.* (Pessoa e Martins, 1988; Medeiros *et al.*, 2005). O ciclo biológico do agente infeccioso das leishmanioses está resumido na figura 1.

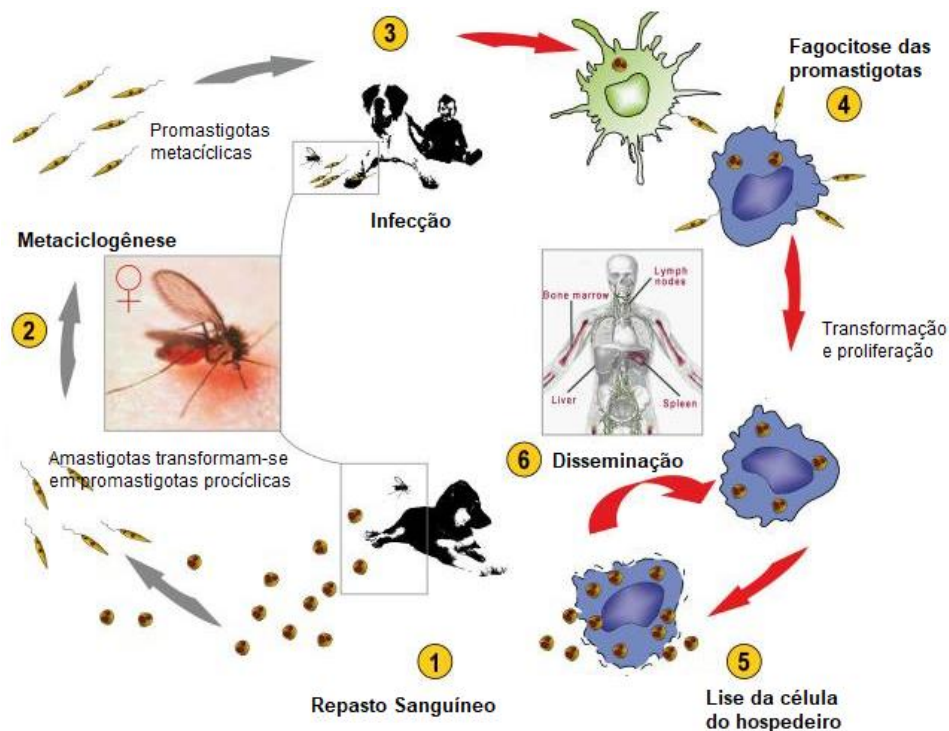


Figura 1. Ciclo biológico do parasito *Leishmania spp.* 1. Infecção do inseto vetor fêmea no momento em que realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado (ingestão de amastigotas). 2. Transformação das formas amastigotas em promastigotas metacíclicas no interior do vetor. 3. Penetração ativa das formas promastigotas metacíclicas e infecção do hospedeiro mamífero. 4. Fagocitose dos parasitos por macrófagos, onde ocorre a transformação em amastigotas e proliferação. 5. Lise da célula hospedeira com liberação das amastigotas. 6. Disseminação dos parasitos para órgãos e tecidos do hospedeiro mamífero e possibilidade de um novo repasto sanguíneo pelo inseto vetor. Adaptado de Nieto *et al.* (2011).

2.3 Manifestações clínicas das leishmanioses

As leishmanioses possuem uma grande variedade de manifestações clínicas, e sua patogenia pode ser definida por características relacionadas aos hospedeiros, como os fatores genéticos e imunológicos, aliados aos fatores correspondentes ao parasito, como a virulência da espécie infectante e os componentes salivares do vetor (Kane e Mosser, 2001; Sharifi *et al.*, 2017).

Em decorrência dessa interação, o desenvolvimento da doença pode ocorrer desde a forma assintomática até variadas formas clínicas. Sendo assim, as leishmanioses podem ser classificadas, de acordo com as manifestações clínicas, em duas grandes categorias, que compreendem a leishmaniose tegumentar (LT): a qual abrange as formas cutânea (LC), cutâneo-localizada (LCL), mucosa (LM) e cutâneo-difusa (LCD); e a leishmaniose visceral (LV) (Kane e Mosser, 2001; Sharifi *et al.*, 2017; Scorza *et al.*, 2017).

A forma clínica mais encontrada nos pacientes com LT é a cutânea (Stebut, 2014). A mesma se enquadra entre as doenças tropicais negligenciadas, e é prevalente em países de baixa renda (Molyneux, 2014). Trata-se de uma doença que pode acarretar uma vasta gama de sintomas, desde lesões de cura espontânea até lesões abertas, sendo que pode haver comprometimento da pele, levando a desfigurações. No processo de cura clínica, as úlceras deixam cicatrizes permanentes, gerando um impacto psicológico significativo, e desse modo, despertando outras doenças, como, por exemplo, depressão e ansiedade e, conseqüentemente, levando a uma diminuição da qualidade de vida do indivíduo (da Silva, *et al.*, 2017; Moosavian *et al.*, 2019).

A LCL possui uma lesão inicial que, regularmente, é caracterizada como uma pápula eritematosa de aspecto firme, e geralmente é atribuída à picada do vetor, que ocasionalmente ocorre em regiões mais expostas do corpo, como face e membros superiores e inferiores. Essa lesão, no decorrer do tempo, tende a aumentar gradativamente de forma periférica, de modo que o centro da mesma é constituído por uma crosta sanguinolenta que, posteriormente, resulta em uma úlcera. Essas lesões iniciais também podem se apresentar como uma vesícula com infiltração nas bordas ou até mesmo como placas de aspecto eritematoso (Gontijo *et al.*, 2003; Paniz-Mondolfi *et al.*, 2017).

A LM, em geral, acontece posteriormente a uma aparente solução da infecção cutânea (Daneshbod *et al.*, 2011). Na maioria dos casos, ocorre em indivíduos que possuem histórico de leishmaniose cutânea localizada, e que apesar de terem tido uma boa resposta ao tratamento, algum tempo após a doença inicial, podendo variar de meses a anos, manifestam lesões no trato respiratório superior (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2017). As lesões, nesse caso, são de caráter infiltrante e podem gerar destruição parcial ou total da mucosa do nariz, boca, faringe, laringe e traqueia. Desse modo, é uma manifestação clínica que pode resultar em uma deformidade considerável no local da lesão, acarretando problemas para os pacientes frente à rejeição da sociedade (WHO, 2015).

A LCD trata-se de uma forma mais rara e grave da leishmaniose cutânea localizada e têm como característica o surgimento de diversas lesões satélites que podem agregar e formar placas que revestem grandes áreas da pele. Essas lesões, normalmente, são nodulares ou papulosas, além de conterem a forma amastigota do

parasito em abundância e raramente se ulceram (Goto e Lindoso, 2010; Scorza *et al.*, 2017). O fato das lesões estarem disseminadas por todo o corpo pode estar relacionado à ineficiência ou ausência de resposta celular por parte do sistema imune do hospedeiro (Desjeux, 2004).

A LV possui como característica sintomas como febre e hepatoesplenomegalia, além de estar associada à deficiência nutricional e, conseqüentemente, à perda de peso. Alguns pacientes, por razões ainda desconhecidas, mas que se pressupõe estarem associadas ao parasito e as respostas imunes efetivas, podem desenvolver a forma mais grave da doença (Fievez *et al.*, 2019), que pode ser fatal se não tratada (Ready, 2014).

As manifestações clínicas são de intensidade variável, sendo que indivíduos podem permanecer assintomáticos por longos períodos de tempo, fator que dificulta o diagnóstico clínico, embora cerca de 20% dos pacientes infectados desenvolvam a forma aguda da doença. Os sintomas possuem caráter progressivo e as complicações decorrentes da evolução da doença são responsáveis pelos óbitos (Badaró *et al.*, 1986; Gama *et al.*, 2004).

Na LVC, os animais podem permanecer infectivos por um longo período de tempo. Frequentemente, estes animais não apresentam manifestações clínicas, mas, no entanto, possuem uma alta taxa de infecção (Baneth *et al.*, 2008). Cães assintomáticos exprimem uma resposta imune celular predominante, com presença de níveis elevados de IL-2 e TNF- α e uma resposta mista Th1/Th2, sendo prevalente a resposta Th1, mediada especialmente por citocinas IL-12, IL-18 e IFN- γ . Por outro lado, animais que apresentam sinais clínicos demonstram uma fraca resposta celular, com baixos níveis de IFN- γ e uma resposta humoral elevada frente aos antígenos do parasito (Palatnik-de-Souza *et al.*, 2012).

Os sinais clínicos mais comuns entre os animais sintomáticos são alterações dermatológicas, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, perda de peso, uveíte, onicogribose, alopecia e ceratoconjuntivite (Ettinger e Feldman, 2004).

2.4 Diagnóstico da leishmaniose visceral humana

O diagnóstico precoce seguido de um tratamento completo são elementos primordiais na diminuição da disseminação da leishmaniose visceral (Singh e Sundar, 2015), no entanto, a toxicidade do tratamento, bem como seu alto custo, enfatiza a

importância de um teste diagnóstico confirmatório com alta especificidade e sensibilidade, uma vez que, o controle dos casos individuais e também a adoção de medidas de controle são prejudicadas por ferramentas diagnósticas inadequadas (Diro *et al.*, 2017).

O teste diagnóstico para as leishmanioses é feito com base em avaliações dos sinais clínicos relacionados a dados epidemiológicos locais, bem como a exames laboratoriais específicos (Tesh, 1995). A técnica considerada como padrão ouro no diagnóstico da LV é o exame parasitológico, que consiste na visualização da forma amastigota do parasito no interior de macrófagos e é realizada através de exame microscópico de aspirados de baço, medula óssea ou linfonodo. É uma técnica normalmente usada, apesar de ser arriscada, dolorosa e invasiva (Griensven e Diro, 2012; Pace, 2014).

Apesar da identificação dos parasitos através da análise microscópica ser definitiva para manter a elevada especificidade do teste, devido à distribuição não homogênea dos parasitos nos órgãos, a sensibilidade se torna inconstante. A eficácia da detecção parasitária pode variar de acordo com o órgão, sendo de 93% a 99% para aspirados do baço, de 53% a 86% para amostras da medula óssea e de 53% a 65% em aspirados de linfonodo (Reithinger *et al.*, 2007).

Por mais que haja uma elevada confiabilidade de detecção parasitária ao utilizar o aspirado de baço, complicações derivadas da técnica podem ocorrer, como por exemplo a possibilidade de hemorragias durante o processo, requerendo assim algumas precauções rigorosas para a segurança, como uma boa infra-estrutura clínica e especialização complexa do médico, o que acaba por limitar o uso dessa técnica (Reithinger *et al.*, 2007).

O método imunológico pioneiro no diagnóstico laboratorial foi o teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM), que se baseia em uma reação de hipersensibilidade tardia mediada por células T de memória que possuam especificidade contra antígenos do parasito; contudo, existem algumas adversidades com relação ao teste, sendo que indivíduos saudáveis e que vivem em áreas endêmicas da doença, pacientes curados ou aqueles com doenças correlacionadas, podem apresentar resultados falso positivos para leishmaniose. Além disso, indivíduos que tiveram a forma difusa da doença, que sejam recém infectados ou imunossuprimidos, podem apresentar resultados falso negativos, o que aponta uma

variação na sensibilidade do teste (Weigle *et al.*, 1991; de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015). Dessa forma, em razão da variação da sensibilidade e da especificidade, esta técnica entrou em desuso (Espir *et al.*, 2016).

Outras técnicas que empregam métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR *real time*, que surgiu posteriormente e possibilita a quantificação da carga parasitária, têm a vantagem de replicar o genoma do parasito desde uma quantidade mínima de DNA circulante nas amostras biológicas (Lima-Junior *et al.*, 2013; Akhoundi *et al.*, 2017; Hossain *et al.*, 2017), sendo que, esses testes visam a detecção de ácidos nucleicos específicos do parasito (Sundar e Rai, 2002; Srivastava *et al.*, 2011; de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

A detecção de DNA por meio de PCR realizado em aspirados de sangue e de medula óssea indica uma sensibilidade mais elevada em comparação ao exame parasitológico (Deborggraeve, *et al.*, 2008; Adams, *et al.*, 2013; Hossain *et al.*, 2017), contudo, existem limitações quanto ao seu uso, já que a técnica é realizada em apenas alguns centros de pesquisa e hospitais de referência. Além disso, dependendo da amostra analisada, essa técnica pode apresentar variações com relação à sensibilidade, devido ao fato de diferentes órgãos ou frações teciduais poderem ou não demonstrar a presença homogênea de parasitos. Ademais, possuem um alto custo e necessitam de profissionais especializados (Sundar e Rai, 2002; Srivastava *et al.*, 2011; de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

Testes sorológicos, tais como o ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio de imunofluorescência indireta (IFAT), teste de aglutinação direta (DAT), Western-blot e o teste imunocromatográfico (ICT) podem ser usados no sorodiagnóstico laboratorial das leishmanioses e fundamentam-se na detecção de anticorpos específicos dos parasitos em amostras de soro ou de plasma dos indivíduos, entretanto, também há possibilidade de apresentarem variações com relação à sensibilidade e/ou especificidade dos testes (Srivastava *et al.*, 2011; de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

Dentre os testes laboratoriais para o sorodiagnóstico da LV, a técnica de ELISA é a mais comumente usada, apesar da sensibilidade e da especificidade dependerem dos antígenos utilizados. Uma vantagem é que esta técnica é simples de ser executada, além de ser adaptável ao uso de diferentes moléculas antigênicas. Em contrapartida, necessita de equipe qualificada e equipamentos sofisticados e, por tais fatos, nem sempre é viável para algumas áreas endêmicas (Elmahallawy *et al.*, 2014).

Das ferramentas atualmente disponíveis para o diagnóstico da LVH, existe um teste imunocromatográfico baseado no antígeno k39. Essa proteína tem a capacidade de reconhecer anticorpos específicos antileishmania do complexo *donovani*. Trata-se de um teste rápido, possível de ser utilizado em condições de campo e de fácil execução (Sundar *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2012). Porém, o teste de fita possui limitações, podendo detectar pacientes com outras doenças como falso-positivos (Mandal *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos desenvolvidos em relação ao diagnóstico das leishmanioses utiliza o extrato protéico solúvel de *Leishmania* (SLA) no preparo dos testes, uma vez que este antígeno possui elevada sensibilidade. Entretanto, um dos grandes problemas encontrados é a baixa especificidade do teste, pois podem ocorrer reações cruzadas com outras doenças que acabam por acusar resultados falso-positivos (Souza *et al.*, 2013; De Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

Uma boa opção, que proporciona uma melhoria na especificidade dos testes, é a utilização de moléculas semi-purificadas ou purificadas do parasito, além do uso de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos; o que pode permitir uma melhor discriminação da doença com outras patologias que podem gerar reações sorológicas cruzadas (Celeste *et al.*, 2014).

2.5 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos do parasito no ciclo de transmissão urbano da LV, desempenhando um importante papel sobre o mesmo, e, conseqüentemente, afetando o homem, pois aumenta as chances de que este seja infectado através do inseto vetor. Vale salientar que no ciclo silvestre, animais como lobos, raposas e coiotes, entre muitos outros, também podem atuar como reservatórios da doença (Costa, 2011).

A realização do diagnóstico clínico da LVC é dificultada, já que existe uma vasta diversidade de sintomas dessa enfermidade. Além disso, alguns animais podem seguir assintomáticos por períodos significativos de tempo, mas ainda sim permanecerem infecciosos ao vetor (Gomes *et al.*, 2008).

Frequentemente, realiza-se o diagnóstico da LVC com base na detecção de parasitos em aspirados de baço, linfonodo e/ou medula óssea (Santos *et al.*, 2018), no entanto, métodos parasitológicos diretos podem culminar em resultados falso

negativos, gerados talvez pelos baixos níveis de *Leishmania* nas amostras clínicas ou simplesmente pela dificuldade na identificação morfológica do parasito. Somado a isso, deve-se considerar o fato da técnica ser altamente invasiva (Gomes *et al.*, 2008; Pessoa-e-Silva *et al.*, 2019).

Técnicas sorológicas, tais como IFAT, DAT e ELISA, são usadas no sorodiagnóstico da LVC, entretanto, essas metodologias apresentam vantagens e desvantagens (Nunes *et al.*, 2015). Tais métodos se fundamentam na detecção de anticorpos específicos ao parasito, em amostras de soro ou de plasma; entretanto, existe uma probabilidade de retratarem adversidades com respeito à sensibilidade e à especificidade dos testes, pois podem ocorrer problemas em decorrência de resultados falso-positivos devido à reatividade cruzada em cães infectados, por exemplo, com *T. cruzi* e *E. canis*, bem como a ocorrência de falso-negativos (Gomes *et al.*, 2008; de Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015).

A técnica de ELISA usando o SLA é bastante empregada para identificar cães com LV, no entanto, o uso do antígeno bruto leva a resultados inconsistentes, uma vez que não geram bons resultados de sensibilidade quando avaliados cães assintomáticos, e também não gera especificidade satisfatória, já que a reatividade com anticorpos de animais apresentando doenças cruzadas podem levar a resultados falso-positivos (Porrozzi *et al.*, 2007; Miro *et al.*, 2008).

A tecnologia de DNA recombinante, que permite o desenvolvimento de proteínas antigênicas em bactérias, de forma isolada ou combinada, vem sendo utilizada na busca de novos alvos para emprego nos ensaios sorológicos (Gomes *et al.*, 2008). O uso de proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos, assim como as combinações entre antígenos (Porrozzi *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2009), têm sido avaliados por ELISA com o objetivo de se conseguir um teste diagnóstico que seja mais sensível e específico para doença (Kubar e Fragaki, 2005).

Estudos mostraram a utilização de proteínas isoladas e que possivelmente poderiam ser utilizadas como um potencial antígeno a compor um teste diagnóstico para LVC mais sensível e específico, como a proteína recombinante rLc36, que foi expressa em *L. infantum* e foi capaz de discriminar os casos assintomáticos da doença, demonstrando resultados satisfatórios, e sugerindo, dessa forma, ser um alvo promissor no sorodiagnóstico da doença (Nogueira *et al.*, 2018).

Outro estudo apresentou a proteína recombinante proibitina, que foi identificada em *L. infantum* e reconhecida por anticorpos nos soros de animais sintomáticos e assintomáticos para LV. Os resultados apontaram altos valores de sensibilidade e especificidade da mesma, principalmente, quando comparada ao SLA, sugerindo sua aplicação como um possível marcador diagnóstico da doença (Dias *et al.*, 2018). Também, foram identificadas proteínas como, LiHyp1 (Martins *et al.*, 2015), rLiHyd (Lage *et al.*, 2016) e MAPK3 (Menezes-Souza, *et al.*, 2015), que apresentaram boa eficácia diagnóstica para a LVC e LVH. Em um trabalho desenvolvido por Salles *et al.* (2019), foi demonstrada a utilização da proteína SMP-3, bem como de um epítipo específico de células B dessa proteína, como marcadores diagnósticos da LV canina e humana.

Além destas, algumas pesquisas apontaram o desempenho do uso de antígenos combinados, como uma proteína quimérica, rK28, composta pela fusão dos antígenos k9 com unidades de repetição de k39 e k26, cuja versão recombinante demonstrou bons valores de especificidade e sensibilidade (Boarino *et al.*, 2005). No Brasil, foi protocolado pelo Ministério da Saúde através de uma Nota Técnica Conjuntiva em 01/2011 em que se orienta a utilização de um teste imunocromatográfico, DPP, como método de triagem para o diagnóstico da LVC, e ELISA como método confirmatório (Souza-Filho *et al.*, 2016).

O DPP é um teste rápido composto por antígenos recombinantes, rK26 e rK39, os quais concedem uma elevada sensibilidade e especificidade ao teste no reconhecimento de cães sintomáticos para leishmaniose. Contudo, ao se avaliarem cães assintomáticos, há uma redução significativa na sensibilidade do teste, fazendo com que haja uma variação na eficácia do mesmo. (Grimaldi *et al.*, 2012; Chaabouni *et al.*, 2018).

Outros fatores que enfatizam a variação na eficácia de testes diagnósticos para LVC são os animais estarem vacinados ou apresentarem doenças de reação cruzada (Chaabouni *et al.*, 2018).

Atualmente, no Brasil, a vacina licenciada para a LVC é a Leish-Tec[®], composta pela proteína recombinante A2 (Fernandes *et al.*, 2008). Dessa forma, um teste diagnóstico adequado, além de detectar a doença em cães infectados, deve preservar a especificidade do teste quando usadas amostras de soro de animais vacinados,

objetivando a discriminação entre esses e aqueles que estão infectados (Kubar e Fragaki, 2005).

Em países endêmicos, como o Brasil, uma das principais estratégias para o controle da LV tem sido o diagnóstico da doença acompanhado da eutanásia dos cães positivos, sendo assim, é importante um diagnóstico preciso que possibilite a identificação correta dos cães infectados pelo parasito, a fim de que se evite eliminar cães falso-positivos (Regina-Silva *et al.*, 2014).

Resultados falso-negativos representam também um grave problema, de modo a permitir a presença destes animais reservatórios em meio a sociedade e a potencial disseminação da doença (Werneck, 2014). Por isso, para compor um método diagnóstico eficaz, é importante a busca por antígenos que possam conceder elevada sensibilidade e especificidade em animais que sejam sintomáticos, assintomáticos, bem como aqueles que sejam vacinados ou que possuem doenças correlacionadas.

2.6 Proteína Amastina

Neste trabalho, a proteína amastina (XP_003392700.1), que foi identificada por Coelho *et al.* (2012) através de um estudo imunoproteômico realizado com soros de cães com LV, foi avaliada quanto a sua antigenicidade para detecção da LV canina e humana. Coelho *et al.* (2012) identificaram a proteína nas formas amastigotas de *L. infantum*, demonstrando sua capacidade em reconhecer anticorpos presentes em soro de cães com LV sintomática e assintomática.

O gene responsável pela codificação da proteína amastina foi identificado no cromossomo 30 e possui 525 pares de base (pb). A sequência de aminoácidos possui 174 resíduos linearizados (Figura 2), totalizando um peso molecular de aproximadamente 19,836 kDa.

```
MPQGQYSQKPN DGPTQPVKTRPGQNVYTG NPMNAPGSRPAVYYREGPWHYSLCVCCEDMDS CCEACCCFP  
CQVSRQCNMFMYNRREIHWPYCLLMIVFDLYLPFSISCVFASETRRLARERYGISGTGCEDFCIGYWCRT  
CSAQQVLLLEMIVMNEFFGAMCFE AAPQPAANRMV
```

Figura 2: Sequência de aminoácidos da proteína amastina.

A proteína amastina, conforme ferramentas de bioinformática, se encontra conservada em várias espécies de *Leishmania spp.*, como *L. infantum* e *L. donovani*, que são causadoras da LV, e *L. major*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*, causadoras da LT.

Esta proteína integra uma família de glicoproteínas codificadas por genes presentes na família Trypanosomatidae, entretanto, até o presente momento, a função da amastina não está determinada (He *et al.*, 2019). Os genes da amastina codificam antígenos de superfície que são pertencentes a uma família multigênica, apresentando mais de 40 genes em *L. infantum* (Dupé *et al.*, 2014), sendo que a maior parte desses genes é específica para o estágio amastigota do ciclo de vida parasítico (Rochette *et al.*, 2009).

Trata-se de uma proteína transmembrana, que possui quatro domínios membranares, o que leva a pressupor que exerça um papel no transporte de íons, nutrientes ou envolvimento na sinalização celular. Também, em *Leishmania*, foi demonstrada como um biomarcador relevante para o diagnóstico sorológico da LV (Rafati *et al.*, 2006; Slathia *et al.*, 2018). Além disso, estudos inferem que proteínas amastinas têm um papel primordial na patogênese da infecção de *Leishmania*, sendo considerada como fatores de virulência nos parasitos (Salotra *et al.*, 2006).

Desse modo, a proteína parece operar na interface parasito-hospedeiro, e é provável que esteja envolvida na indução de resposta celular e humoral, o que permitiu que fosse utilizada para o sorodiagnóstico da LV humana (Rafati *et al.*, 2006). Uma vez descrita a importância da amastina para o parasito *Leishmania spp.* (Paiva *et al.*, 2015), há a necessidade de se realizar mais estudos com a finalidade de validar o emprego da proteína para compor um possível teste diagnóstico da doença.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a proteína amastina, em sua versão recombinante e de epítipo específico de célula B, para o diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral canina e humana.

3.2 Objetivos específicos

⇒ Clonar, expressar e purificar a proteína amastina sob a forma recombinante.

⇒ Identificar, por bioinformática, e sintetizar um epítipo específico de célula B da proteína amastina.

⇒ Avaliar a reatividade de soros de cães com LV sintomática e assintomática, e amostras de outras classes de soros (animais saudáveis de área endêmica e não endêmica para leishmanioses, cães vacinados e cães infectados com *E. canis*, *T. cruzi* e *B. canis*) contra a proteína recombinante amastina e seu epítipo sintético, contra a proteína rA2 e SLA dos parasitos.

⇒ Investigar a reatividade de soros de pacientes LVH, de indivíduos saudáveis de área endêmica e não endêmica para as leishmanioses e soros de pacientes com hanseníase, doença de Chagas, arpergilose, paracoccidiodomicose, contra a proteína recombinante amastina e seu epítipo sintético, contra a proteína rA2 e SLA dos parasitos.

⇒ Avaliar os valores de sensibilidade e especificidade para a proteína amastina e de seu epítipo sintético para o diagnóstico sorológico de LV canina e humana.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de soros caninos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (244/2018) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Para a avaliação da antigenicidade da proteína rAmastina, 170 amostras de soro de cães (*Canis familiaris*), machos e fêmeas e de diferentes raças e idade, foram utilizadas. Os animais com LVC (n=50) foram positivos nos testes de PCR e apresentaram resultados positivos utilizando os kits IFAT-CVL e EIE-CVL BioManguinhos® (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Soros de animais não infectados por *Leishmania spp.* apresentaram resultados sorológico, molecular e clínico negativos, sendo que foram selecionados de área endêmica (n=25; Belo Horizonte) e não endêmica (n=25; Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil) para as leishmanioses. Soros de animais não infectados, mantidos isolados em canil e imunizados com a vacina Leish-Tec® (n=25) e de animais experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* (n=15), *Babesia canis* (n=15) ou *Erlichia canis* (n=15) também foram utilizados nos ensaios sorológicos.

4.2 Amostras de soros humanos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CAAE-32343114.9.0000.5149) da UFMG. Para realização dos testes sorológicos, foram obtidas amostras de soro de pacientes com LV (n=30, sendo 19 homens e 11 mulheres, com idades entre 26 e 56 anos) de uma área endêmica (Belo Horizonte) para as leishmanioses. As amostras positivas foram confirmadas por PCR em aspirados de baço e/ou medula óssea. Amostras de soro de indivíduos não infectados que vivem em áreas endêmicas (n=30, incluindo 17 homens e 13 mulheres com idades variando de 24 a 55; Belo Horizonte) ou não endêmicas (n=30, sendo 16 homens e 14 mulheres com idades variando de 23 a 54 anos, Poços de Caldas) para as leishmanioses também foram avaliadas, sendo que esses indivíduos não apresentaram quaisquer sinais clínicos, bem como apresentaram resultados sorológicos negativos para a doença. Soros de pacientes com doença de Chagas (n=20), com a infecção confirmada por hemocultura e kit de ELISA recombinante Chagatest v. 3.0 ou inibição da hemaglutinação de Chagatest (HAI) (Wiener Lab, Argentina), amostras de paracoicidiodomicose (n=10), hanseníase (n=10) e

aspergilose (n=10), foram utilizados para avaliação da reatividade cruzada do antígeno experimental.

4.3 Mapeamento de epítopos específicos de células B da amastina

A sequência de aminoácidos da proteína amastina, cujo número de identificação é XP_003392700.1, foi analisada através de bancos de dados disponíveis no NCBI e Trityp DB. Alinhamentos gênicos foram realizados pelo programa Clustal Omega e BLAST-p, buscando avaliar a conservação da identidade gênica da amastina em outras espécies de Tripanossomatídeos. A predição de epítopos de células B foi realizada usando o servidor ABCpred, de acordo com o descrito em Saha e Raghava *et al.*, 2006. Em seguida, a sequência peptídica (LPFSISCVFASETRRLARERYGISG) foi sintetizada (Genscript®, USA).

4.4 Antígenos utilizados para os ensaios de ELISA

4.4.1 Preparo do extrato protéico solúvel de *Leishmania infantum*

O extrato antigênico solúvel de *Leishmania* (SLA) foi produzido de acordo com o descrito por Coelho *et al.*, 2003. A cepa de *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) foi cultivada em meio de cultura de Schneider's completo, constituído pelo meio de Schneider's (Sigma-Aldrich, EUA) acrescido com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Sigma-Aldrich, EUA), L-glutamina 20 mM, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4; e incubada a 24°C. Decorridos seis dias de cultivo e sendo constatada a viabilidade e a ausência de agentes contaminantes, as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram quantificadas em câmara de Neubauer, sendo ajustadas para uma concentração de 2×10^8 promastigotas por mL. Para o preparo do SLA, os parasitos foram centrifugados por 15 min, a 2.000 x g e a 4°C (modelo Z300K - Hermle Labortechnik GmbH). O *pellet* foi lavado em 5 mL de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS 1x) e centrifugado a 2.000 x g por 10 min a 4°C. O processo de lavagem foi realizado por 3 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspensionado em 5 mL de PBS 1x e submetido a um processo de choque térmico em nitrogênio líquido e banho maria a 37°C, por 6 ciclos. Em seguida, o lisado foi sonificado em seis ciclos de 30 seg, com intervalos de 30 seg e amplitude de 38 MHz. O produto da lise foi centrifugado a 10.000 x g durante 20 min e a fração antigênica

solúvel, que corresponde ao SLA, foi coletada. A concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e as amostras foram armazenadas a -80°C, até o momento do uso.

4.4.2 Clonagem e expressão das proteínas rAmastina e rA2

4.4.2.1 Extração do DNA genômico dos parasitos

A cepa de *L. infantum* foi utilizada para a extração do DNA genômico e clonagem das proteínas rAmastina e rA2. Formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram quantificadas e 1×10^9 parasitos foram utilizados para a extração do DNA genômico. Os mesmos foram centrifugados (4.000 x g por 20 min) e lavados em 3 mL de PBS 1x estéril, por duas vezes. O precipitado final foi ressuscitado em tampão Tris-EDTA (TE, o qual foi constituído por Tris-HCl 10 mM pH 7,0 e EDTA 1 mM) e novamente centrifugado. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em solução de lise (NaCl 150 mM, EDTA 250 mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, sarcosil 0,5% e RNase 10 µg/mL) e incubado por 30 min e a 50°C, seguindo de imersão em banho de gelo por 10 min, sob agitação constante. A suspensão foi submetida a duas extrações com fenol:clorofórmio na proporção de 1:1 e, em seguida, tratada com clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1. Para a precipitação do DNA foram adicionados 2 vezes o volume de etanol absoluto (Merck) resfriado e 1 mL de NaCl 2 M. A suspensão foi incubada a 4°C por 16 h e, posteriormente, recuperada por centrifugação (14.000 x g por 30 min). O precipitado foi ressuscitado em 1 mL de uma solução de etanol 70% resfriado e acetato de sódio 0,3 M, recuperado por centrifugação nas mesmas condições anteriores e seco a 37°C. O DNA foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE. Para verificar a qualidade e a quantidade de material obtido, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma) em tampão TAE (Tris 40 mM, Ácido Acético 20 mM e EDTA 1 mM). O gel foi corrido a 80 volts (V) e corado com brometo de etídio (10 µg/mL), o qual se liga aos fragmentos de DNA e emite fluorescência quando na presença de luz ultravioleta (UV). A dosagem foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e a amostra foi armazenada a -20°C.

4.4.2.2 Amplificação e clonagem das sequências gênicas por PCR

A região codificadora das proteínas foi amplificada por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores complementares aos fragmentos. O gene responsável pela codificação da proteína amastina foi amplificado e clonado de acordo com o protocolo descrito por Duarte *et al.*, 2015, enquanto a proteína A2 foi obtida como descrito por Zhang *et al.*, 1996. A reação de amplificação dos genes de interesse foi realizada utilizando o kit GoTaq[®] DNA Polymerase, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). A termociclagem foi padronizada em um ciclador térmico (Tonegen Palm, Tonederm). Após a reação, os produtos da PCR foram aplicados em um gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio para serem identificados. Os produtos da PCR foram quantificados utilizando o comprimento de onda 260/280 nm no aparelho NanoDrop[®] 2000 (Thermo scientific) e ligados em vetor de clonagem pGEM[®]-T (Promega, EUA) para *Escherichia coli* (Phoneutria, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante (T4 DNA Ligase – Promega). Os clones positivos foram utilizados para a construção do vetor de expressão.

4.4.2.3 Sequenciamento dos genes

Após a clonagem dos genes de interesse, amostras dos plasmídeos purificados (PureYield[™] Plasmid Miniprep System, Promega) foram separadas para a realização do sequenciamento automático de DNA de alta qualidade e para a confirmação das identidades dos insertos. Os sequenciamentos foram realizados em *MegaBACE 1000 DNA Sequencing System* (GE Healthcare) e analisados pelo Núcleo de Análise de Genoma (NAGE), do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG.

4.4.2.4 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Para verificar a cinética de expressão das proteínas, foi realizado um experimento piloto utilizando 20 mL de cultura de cada bactéria transformada com o plasmídeo pET28a-TEV em células “Arctic Express” (Agilent Technologies, USA). Após a densidade ótica (DO) da cultura alcançar aproximadamente uma leitura de 0,6, em comprimento de onda de 600 nm, uma alíquota de 1 mL foi removida, sendo correspondente ao tempo não induzido. As culturas foram induzidas com 0,8 mM de IPTG e após a indução, alíquotas de 1 mL foram retiradas para confirmação da expressão em gel SDS-PAGE. Para a purificação em larga escala, a expressão das

proteínas foi realizada em 2 L de cultura, dentro das condições padronizadas. A lise das bactérias foi realizada em ultrassom (6 pulsos de 30 seg a 38MHz, com intervalos de 30 seg, seguidos por sete ciclos de congelamento e descongelamento) e a amostra foi centrifugada a 14.000 x g por 40 min. A proteína recombinante amastina (19.8 kDa) foi purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel HisTrap HP conectada a um sistema AKTA (GE Healthcare, EUA). A proteína recombinante A2 (53.0 kDa) foi produzida como descrito por Zhang *et al.* (1996). As amostras foram dialisadas frente a PBS 1x. As proteínas foram submetidas à purificação por gel filtração Superdex™ 200 (GE Healthcare Life Sciences, EUA) e em seguida, passadas em uma coluna de agarose-polimixina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para remoção de qualquer endotoxina residual de bactéria. As proteínas purificadas foram estimadas pelo método de Bradford, aplicadas em gel SDS-PAGE a 12% para confirmação do peso molecular e estocadas a -80°C, até o momento do uso.

4.5 Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%

A eletroforese de proteínas em gel desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada pelo sistema de Minigel da BioRad (Hercules, CA, USA) para géis de poli(acrilamida) descontínuos, segundo Laemmli (1970). O gel de separação foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e bis-acrilamida a 0,8% p/v, diluída em uma concentração final de 12% v/v, sendo acrescido de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS a 10% p/v. Para o gel de concentração, a solução estoque foi diluída a 4% v/v em Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS a 0,1% p/v. A polimerização dos géis ocorreu na presença de persulfato de amônio (PSA) a 10% p/v e de N, N, N', N'-Tetrametil-etilenodiamina (TEMED; Sigma) a 1:2.000 v/v. As amostras de SLA e das proteínas recombinantes A2 e amastina foram diluídas (na proporção de 1:1) em tampão de amostra em condições redutoras (Tris-HCl 0,7 M, pH 6,8, azul de bromofenol a 0,25%, glicerol a 10%, β-mercaptoetanol a 2,5% e SDS a 4%). Após a diluição, as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 5 min e aplicadas no gel em uma concentração de 40 µg de SLA e 30 µg de cada proteína recombinante. A corrida eletroforética foi realizada por 2 h a 100V em tampão de corrida TBE1x (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). O gel foi corado pelo azul brilhante de Comassie (Comassie Blue R250 em etanol a 50% e ácido fosfórico a 10%) e

descolorado por lavagens sucessivas com solução descolorante (ácido acético 10%, metanol 40% e água destilada 50%).

4.6 ELISA para o sorodiagnóstico da LV

Para avaliar a antigenicidade da proteína rAmastina e seu peptídeo, curvas de titulação foram previamente realizadas para determinar a melhor concentração da proteína recombinante ou do SLA, bem como a melhor diluição dos conjugados a serem utilizados nos testes sorológicos. Placas de microtitulação para ELISA de 96 poços (JetBiofil®, Belo Horizonte) foram sensibilizadas com 0,5, 1,0, 2,0 e 2,0 µg/poço de rAmastina, peptídeo sintético, rA2 ou SLA de *L. infantum*, respectivamente. Os antígenos foram diluídos em 100 µL de tampão (carbonato de sódio 0,1M e bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6) e incubadas durante 16 h a 4°C. O bloqueio da placa foi realizado usando 250 µl de PBS 1x mais Tween 20 a 0,05% (PBS-T) combinado com 5% de caseína durante 1 h e a 37°C. Após 5 lavagens, as placas foram incubadas com 100 µL dos soros individuais (em duplicata) a uma diluição de 1:200 (canino) e 1:400 (humano), em tampão de incubação (TI – solução de lavagem acrescida de 0,05% de caseína). As amostras permaneceram em incubação durante 1 h e a 37°C e então as placas foram lavadas novamente por 7 vezes. Os anticorpos anti-IgG (Sigma), conjugados à peroxidase, foram utilizados em uma diluição de 1:20.000 ou 1:10.000, respectivamente, diluídos em TI e aplicados 100 µL por poço, permanecendo em incubação à 37°C por 1 h. As placas foram lavadas por 7 vezes e incubadas com 100 µL da solução reveladora (10 mL de tampão citrato-fosfato (Na₂HPO₄ 24 mM e ácido cítrico 17,5 mM para 1 L de água destilada, pH 5,0); 2 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) e 2 µL de H₂O₂) durante 30 min e protegido da luz. A reação de revelação foi interrompida adicionando-se 25 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 3 M e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá), no comprimento de onda de 492 nm. Controles positivos e negativos foram utilizados.

4.7 Análise estatística

Os resultados das leituras das placas foram inseridos nas planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0) e analisados usando GraphPad Prism™ (versão 6.0 para Windows). O ponto de corte dos experimentos foi estabelecido usando Curvas

Receiver-operator characteristic (curvas ROC). As curvas para soros caninos foram plotadas com os valores de densidade ótica dos soros de cães com LV, sintomáticos (n=25) e assintomáticos (n=25) versus os dos grupos controle, que consistiam em soros de cães não infectados que vivem em áreas endêmicas (n=25) e não endêmicas (n=25) da doença, bem como dos soros de cães vacinados com Leish-Tec® (n=25) e daqueles que apresentam doenças relacionadas à LV [doença de Chagas (n=15), babesiose (n=15) e erliquiose (n=15)]. As tabelas de contingência e o teste de Fisher foram utilizados para comparar os resultados obtidos para cada antígeno, os quais foram estimados pela avaliação de seus percentuais de sensibilidade diagnóstica (DSe%), porcentagem de especificidade diagnóstica (DSp%), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), área sob a curva (AUC) e razão de verossimilhança (LR). Intervalos de confiança (IC) foram calculados usando um nível de confiança de 95% (IC 95%). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas que regem a redação das dissertações de mestrado e teses de doutorado do Programa de Pós-Graduação, as seções de Resultados e Discussão desta Dissertação serão apresentadas sob a forma de artigo científico. O artigo intitulado “*Diagnostic evaluation of the amastin protein from Leishmania infantum in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls*” foi publicado na revista “*Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*”, classificada com Qualis B1 na área de Medicina II da CAPES.

Referência do artigo:

“Vale DL, Dias DS, Machado AS, Ribeiro PAF, Lage DP, Costa LE, Steiner BT, Tavares GSV, Ramos FF, Martínez-Rodrigo A, Chávez-Fumagalli MA, Caligiorne RB, de Magalhães-Soares DF, Silveira JAG, Machado-de-Ávila RA, Teixeira AL, Coelho EAF. Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019 May 6. pii: S0732-8893(18)30801-0. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.015.”

Title

Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls.

Authors

Danniele L. Vale ^a, Daniel S. Dias ^a, Amanda S. Machado ^b, Patrícia A.F. Ribeiro ^a, Daniela P. Lage ^a, Lourena E. Costa ^a, Bethina T. Steiner ^c, Grasielle S.V. Tavares ^a, Fernanda F. Ramos ^a, Abel Martínez-Rodrigo ^d, Miguel A. Chávez-Fumagalli ^a, Rachel B. Caligorne ^e, Danielle F. de Magalhães-Soares ^f, Julia A.G. Silveira ^g, Ricardo A. Machado-de-Ávila ^c, Antônio L. Teixeira ^{a,h}, Eduardo A.F. Coelho ^{a,i,#}

Affiliations

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil.

^b Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte. Rua Domingos Vieira, 590, Santa Efigênia, 30150-240, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil.

^d Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Science, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.

^e Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte. Rua Domingos Vieira, 590, Santa Efigênia, 30150-240, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^f Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil.

^g Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil.

^h Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX, USA; 1941 East Road, Houston, TX, 77041.

ⁱ Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil.

#Corresponding author

Address: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Phone and fax number: +55 31 3409 4983

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

ABSTRACT

The diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) presents problems due to the toxicity and/or high cost of drugs. In addition, no vaccine exists to protect against human disease. In this study, the antigenicity and immunogenicity of amastin protein were evaluated in *L. infantum*-infected dogs and humans. For the diagnosis, besides the recombinant protein, 1 linear B-cell epitope was synthesized and evaluated in serological assays. Results showed high sensitivity and specificity values to detect the disease when both antigens were employed against a canine and human serological panel. By contrast, when using rA2 and a soluble *Leishmania* antigenic preparation, sensitivity and specificity values proved to be lower. A preliminary immunogenicity study showed that the amastin protein induced high IFN- γ and low IL-10 production in stimulated PBMC derived from treated VL patients and healthy subjects, thus suggesting a potential use of this protein as an immunogen to protect against human disease

Keywords: Amastin; recombinant proteins; synthetic peptides; diagnosis; response immune; visceral leishmaniasis.

1. Introduction

Leishmania protozoa are the causative agents of leishmaniasis in 98 countries worldwide, threatening over 380 million people, more than 12 million of whom are infected by these parasites (WHO, 2016). Visceral leishmaniasis (VL) is a severe clinical manifestation of disease, which accounts for approximately 0.5 million cases annually (Burza *et al.* 2018). In the Americas, the etiological agent is the *Leishmania infantum* species, which is transmitted through the bite of the phlebotomine vector, with dogs representing the main urban reservoirs of the parasites (Savoia 2015). *Leishmania* parasites are found in the form of metacyclic promastigotes that are flagellated and able to transmit the disease to mammalian hosts, whereas the amastigote forms are intracellular and nonflagellated forms found in phagolysosomes from infected mammalian cells, such as neutrophils, macrophages, and dendritic cells, among others (Subramanian and Sarkar 2018).

Clinical manifestations from canine VL (CVL) are variable, ranging from a subclinical or asymptomatic infection to the severe and symptomatic disease (Ferreira *et al.* 2007). Cutaneous and organic alterations, such as lymph node enlargement, skin lesions, loss of weight, lethargy, splenomegaly, fever, ocular alterations, epistaxis, and lameness, have all been found in symptomatic VL (Solano-Gallego *et al.* 2011). In addition, neurological and cardiorespiratory disorders have also been observed (Maia *et al.* 2015). However, many asymptomatic cases can be found in cross-sectional surveys, which can hamper the identification of the infected animals and the success of disease control programs (Almeida-Leal *et al.* 2014). Moreover, human infection can present variable results of the disease, from asymptomatic to subclinical diseases in the hosts. Asymptomatic patients present practically no impact on their state of health, while symptomatic patients can develop clinical manifestations, including lymphadenopathy, fever, diarrhea, malaise, hepatomegaly, and splenomegaly (Michel *et al.* 2011).

The diagnosis of VL is based on parasite detection in aspirates from the spleen, lymph nodes, and/or bone marrow (Santos *et al.* 2018). However, this method presents variable sensitivity and involves invasive procedures for sample collection. Consequently, infected hosts can remain untreated and develop the symptomatic disease (Duthie *et al.*, 2018). More-refined parasitological methods, such as those employing molecular biology, have shown higher performance to diagnose the

disease, since they allow for the detection of a small number of circulating parasites in biological samples, as compared to the conventional parasitological methods (Monteiro *et al.* 2018). However, these incur high costs, require sophisticated equipment, and have no standard methodology for the large-scale molecular diagnosis based on PCR (Nunes *et al.* 2018).

Serological tests have been employed for the diagnosis of disease; however, these also present advantages and disadvantages (Nunes *et al.* 2015). Rapid immunochromatographic tests based on recombinant proteins, such as rK28 and rk36, have been used and have become the preferred diagnostic method for CVL in Brazil, followed by ELISA (EIE-LVC) as a confirmatory test (Souza-Filho *et al.* 2016). Regarding the human disease, the Kalazar Detect™ Test Kit (InBios International, Inc., Seattle, WA) is an immunochromatographic assay applied for the diagnosis of human VL. However, this test cannot discriminate between current, subclinical, or past infections and has proven to be useless for the diagnosis of relapses and as a prognostic test (Sundar and Singh 2018). As a consequence and in addition to the progress in alternate therapeutic strategies, the possibility of developing preventive measures against the disease has been pointed out, such as through the identification of new antigens to be employed for a more specific and sensitive diagnosis (Didwania *et al.* 2017).

However, in both mammalian hosts, tests commonly fail to detect asymptomatic case, because the analyzed material contains few anti*Leishmania* antibodies, which can present cross-reaction with *Leishmania*-related diseases (Chaabouni *et al.* 2018). Moreover, falsepositive results can occur in healthy subjects living in endemic areas of the disease (Salles *et al.*, 2019). Distinct *Leishmania* proteins have been evaluated as antigens for the serodiagnosis of VL (Dias *et al.* 2017; Farahmand and Nahrevanian 2016; Magalhães *et al.* 2017). However, variable sensitivity and/or specificity results have been found. As an alternative, the use of synthetic peptides should also be considered. Since they present a lower cost to produce, a higher yield in the purification production is obtained, thus presenting a higher stability when compared to recombinant proteins or parasite extracts (ChávezFumagalli *et al.* 2013; Lage *et al.* 2015; Noya *et al.* 2003).

A family of closely related transmembrane glycoproteins, namely, amastins, was identified in the *Leishmania spp.* These molecules belong to a family of

developmentally regulated proteins consisting of up to 45 members, codified for small proteins of about 200 amino acid residues, dispersed throughout the parasite genome (Jackson 2010). Amastin proteins seem to operate at the host–parasite interface and are likely to be involved in the development of diseases, such as Chagas disease (Teixeira *et al.* 1994) and human VL (Rafati *et al.* 2006). In the present study, the *L. infantum* amastin gene (XP_003392700.1) was cloned, and the recombinant protein was purified to be evaluated for the serodiagnosis of canine and human VL using serological panels from Brazilian hosts. In addition, bioinformatics tools were used to identify a specific B-cell epitope derived from the protein, which was also evaluated in the serological assays. In addition, preliminary studies were developed to evaluate the immune response in human PBMCs derived from treated and untreated VL patients, as well as from healthy subjects.

2. Materials and methods

2.1. Cloning, expression, and purification of Leishmania amastin protein

The amino acid sequence of the amastin (XP_003392700.1) protein was cloned from *L. infantum* DNA genome using the following primers: 5'-TCATGGATCCATGCCGCAAGGCCAGTA-3' (forward) and 5'-TGATAAGCTTCTAGACCATCCGGTTGGC-3' (reverse), with the BamHI and HindIII restriction enzymes. The DNA fragment was excised from gel, purified, and linked into the pGEM®-T vector (Promega, USA). The recombinant plasmid was then transformed into *E. coli* XL1-Blue (Phonutria, Brazil) cells, and positive clones were used for the construction of the expression vector. DNA fragments obtained from the digestion of pGEM-amastin plasmid were ligated into the pET28a-TEV vector, and Arctic Express cells (Agilent Technologies, USA) were transformed with the recombinant plasmid. Gene insertion was confirmed by colony PCR, and the sequencing was performed in a MegaBace 1000 automatic sequencer apparatus (Amersham Biosciences, USA). For the purification of the recombinant protein (~19.8 kDa), bacteria were induced with 0.8 mM IPTG for 24 h at 12 °C and were shaken at 200 xg per min. Cells were ruptured by 6 cycles of ultrasound, with cycles of 30 s each (38 MHz), followed by 7 cycles of freezing and thawing. Cell debris were removed by centrifugation, and the recombinant protein was passed onto a HisTrap HP affinity

column connected to an AKTA system (GE Healthcare, USA) and further purified on a Superdex™ 200 gel-filtration column (GE Healthcare Life Sciences, USA). The A2 recombinant (rA2) protein was produced as described by Zhang *et al.* (1996). Briefly, pET16b-A2 plasmid, which was kindly provided by Dr. Greg Matlashewski (Microbiology and Immunology Department, McGill University, Montreal, Quebec, Canada), was used to express and purify the recombinant protein (~53 kDa). For this, transformed *E. coli* DH5 α cells were grown in the presence of 1 mM IPTG for 2 h at 34 °C and later disrupted by 7 cycles of freezing and thawing followed by mild ultrasound treatment (5 cycles of 30 s each with an ultrasound processor), in which they were centrifuged at 13,000 \times g for 30 min at 4 °C. The protein was purified by using the gel-filtration column. After purification, both the recombinant amastin and rA2 proteins were passed through a polymyxin-agarose column (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in order to remove any residual endotoxin content (b10 ng of LPS per 1 mg of recombinant protein, measured by the Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Assay QCL-1000, BioWhittaker, MD).

2.2. Bioinformatics to obtain specific B-cell epitope

The process of *in silico* analysis of the amastin (XP_003392700.1) sequence consisted of a comparison with the amino acid sequence from distinct parasite species, where it showed structural similarity: *L. donovani* (XP_003862861.1), *L. major* (XP_001684736.1), *L. major* (XP_001684735.1), *L. mexicana* (XP_003877293.1), and *L. braziliensis* (XP_001566782.1). A comparison with the *L. infantum* amastin sequence was then performed with sequences found in other trypanosomatids: *T. theileri* (ORC76762.1), *T. cruzi* Brener (XP_810211.1), *T. cruzi* (PBJ80659.1), *T. cruzi* (PWU91633.1), *T. rangeli* (AGN32994.1), and *T. rangeli* (XP_009310501.1). In both cases, the BLAST-p algorithm (Gish and States 1993) was used, and alignments were performed by the Clustal Omega program (Sievers *et al.* 2011). The presence of linear B-cell epitopes was then investigated by the ABCpred server (Saha and Raghava 2006) using the following parameters: window size of 14, threshold of 0.85, and overlapping filter: ON. The peptide sequences presenting values higher than 0.85 were considered positive, and the best value (0.89) was selected as being an amastin-specific B-cell epitope. The peptide (LPFSISCVFASERRLARERYGISG) sequence was then synthesized (Genscript®, USA).

2.3. Parasites

L. infantum (MOM/BR/1970/BH46) was used. Stationary promastigotes were grown at 24 °C in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, USA), which was comprised of the medium plus 20% inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, USA), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, pH 7.4. The soluble *Leishmania* antigenic extract (SLA) was produced according to that described by (Coelho *et al.* 2003). To obtain the axenic amastigotes, previous titration curves were performed to determine the best temperature and time of conversion of the promastigotes in amastigote forms. The technical protocol was adapted from Doyle *et al.* (1991) by Mendonça *et al.* (2018). Briefly, 109 *L. infantum* stationary promastigotes were washed 3 times in sterile phosphate buffer saline (PBS 1x) at pH 7.4 and incubated in 5 mL FBS for 72 h at 37 °C. The parasites were then washed in cold PBS 1x pH 7.4, and cell density was estimated by counting in the Neubauer chamber. The conversion of the parasites was evaluated after staining with Giemsa, and the results in the conversion percentage were higher than 90.0%.

2.4. Canine sera

This study was approved by the Committee on the Ethical Handling of Research Animals (protocol number 0333/2015) of Federal University of Minas Gerais (UFMG). Dogs developing VL were classified as asymptomatic (n = 25) or symptomatic (n = 25) based on a score calculated according to the intensity of the following evaluated clinical signs: emaciation, alopecia, anemia, conjunctivitis, dehydration, dermatitis, erosion, ulcerations, lymphadenopathy, and onychogryposis. In this context, asymptomatic animals showed a score between 0 and 3, and symptomatic dogs presented a score of higher than 3, according to that described by Solcà *et al.* (2014). All samples tested positive when applying PCR to detect *L. infantum* kDNA, and infected animals presented positive results by using the IFAT-CVL and EIE-CVL BioManguinhos® kits (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil). Sera obtained from healthy dogs living in endemic (n = 25; Belo Horizonte) or nonendemic (n = 25; Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil) areas of leishmaniasis were used. These animals showed no clinical sign of the disease and presented negative serological results. Samples collected from healthy animals that had been immunized with a commercial vaccine (Leish-Tec®; n = 25) and from those that had been experimentally infected with *Ehrlichia canis* (n =

15), *Babesia canis* (n = 15), or *Trypanosoma cruzi* (n = 15), all of which were maintained in kennels to prevent their contact with transmitting vectors of leishmaniasis, were also used in the serological assays.

2.5. Human sera

Serum samples were also collected from VL patients (n = 30, including 19 males and 11 females, with ages ranging from 26 to 56 years). Infection was confirmed by PCR targeting *L. infantum* kDNA in aspirates from the spleen and/or bone marrow of the patients. The patients were selected from an endemic region of disease (Belo Horizonte). The control group consisted of healthy individuals living in an endemic (Belo Horizonte; n = 30, including 17 males and 13 females, with ages ranging from 24 to 55 years) or nonendemic (Poços de Caldas, Minas Gerais, Brazil; n = 30, including 16 males and 14 females, with ages ranging from 23 to 54 years) areas of VL, none of which presented clinical signs or suspicions of leishmaniasis. Serum samples from Chagas disease patients (n = 20, including 13 males and 7 females, with ages ranging from 24 to 52 years) were also used, with the infection confirmed by hemoculture and Chagatest recombinant ELISA v. 3.0 kit or Chagatest hemagglutination inhibition (HAI) assay (Wiener Lab, Argentina). Samples from paracoccidiodomycosis (n = 10, 5 males and 5 females, with ages ranging from 29 to 51 years), leprosy (n = 10, with 6 males and 4 females, with ages ranging from 30 to 61 years), and aspergillosis (n = 10, including 4 males and 6 females, with ages ranging from 24 to 45 years) patients were used in the assays.

2.6. ELISA for the serodiagnosis of VL

Previous titration curves were performed to determine the most appropriate antigen concentration and antibody dilution to be used. The flexible microtiter immunoassay plates (Jetbiofil®, Belo Horizonte) were then coated with amastin, synthetic peptide, rA2, or *L. infantum* SLA (0.5, 1.0, 2.0, and 2.0 µg per well, respectively), which were diluted in a 100-µL coating buffer (50 mM carbonate buffer), at pH 9.6, for 16 h at 4 °C. After, free binding sites were blocked using 250 µL of PBS 1× plus Tween 20 0.05% (PBS-T) combined with 5% casein for 1 h at 37 °C. Next, plates were washed 5 times using PBS-T and were incubated with 100 µL of canine or human sera (1:200 and 1:400 diluted in PBS-T, respectively) for 1 h at 37 °C. Plates

were washed 7 times in PBS-T and incubated with anti-human or anti-dog IgG horseradish-peroxidase– conjugated antibodies (1:20,000 or 1:10,000, respectively, both diluted in PBS-T; SAB3701282 and A6792 catalogs, respectively; Sigma-Aldrich, USA) for 1 h at 37 °C. The plates were then washed 7 times with PBS-T, and the reaction was developed by incubation with 100 µL of a solution comprised of H₂O₂ 30 vol., ortho-phenylenediamine, and citratephosphate buffer at pH 5.0 for 30 min in the dark. The reaction was then stopped by adding 2 N H₂SO₄, and the optical density (OD) was read in an ELISA microplate spectrophotometer reader (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) at 492 nm. The diagnostic testing was performed under blinded conditions, which means that test readers interpreted the results obtained from each diagnostic technique for a given sample with no knowledge of the results from other analyses.

2.7. In vitro stimulation of human PBMC

The present study was approved by the Human Ethics Committee from UFMG (protocol number CAAE-32343114.9.0000.5149). Blood samples (20 mL) were collected from VL patients (n = 6, including 4 males and 2 females, with ages ranging from 27 to 51 years). Infection was confirmed by PCR in aspirates from spleen and/or bone marrow. Samples were collected before and 6 months after treatment using pentavalent antimonials (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brazil). Patients were submitted to the same therapeutic regimen (20 mg Sb+5 per kg during 30 days), none of whom suffered from any other infections or had any preexisting disease. Upon completing the treatment, a PCR was performed, and no parasite DNA was found in the aspirates of the spleen and/or bone marrow. The control group consisted of noninfected individuals (n = 6, including 3 males and 3 females, with ages ranging from 24 to 48 years) living in an endemic area (Belo Horizonte) of disease. The subjects present no clinical signs and exhibited negative results when tested by the Kalazar Detect™ Test kit. For the PBMC culture, cells (10⁶ cells) were purified by density centrifugation through Ficoll–Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) and cultured in 48-well flat-bottomed tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA) in RPMI 1640 medium, which was added together with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, and 1× nonessential amino acid. PBMCs were incubated alone (medium) or stimulated with the amastin protein or SLA (10.0

and 25.0 µg/mL, respectively) for 5 days at 37 °C in 5% CO₂. The supernatants were then collected, and the IFN-γ and IL-10 production was evaluated by capture ELISA (Human IFN-γ and IL-10 ELISA Sets, BD Biosciences, USA) according to manufacturer's instructions. Results were interpolated from a standard curve using recombinant cytokines. The detection sensitivity for IFN-γ and IL-10 was 2.2 and 3.9 pg/mL, respectively.

2.8. Statistical analysis

Results were entered into Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and analyzed using GraphPad Prism™ (version 6.0 for Windows). Receiver–operator characteristic (ROC) curves were constructed to determine the cutoff values. Curves were plotted using the OD values from VL (asymptomatic and symptomatic) dogs versus those obtained from control or cross-reactive sera. The diagnostic evaluation of the antigens was performed by calculating the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, area under the curve (AUC), and likelihood ratio. Confidence intervals (CIs) were calculated using a 95% confidence level (95% CI). Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Sequence alignment of the amastin protein

A BLAST-p assay showed that the amino acid sequence of the amastin protein presents high structural homology between distinct *Leishmania* spp.: *L. donovani* (99%), *L. major* (85%), *L. mexicana* (72%), and *L. braziliensis* (68%) (Fig. 1), but not in other trypanosomatides, such as *T. rangeli* (40%), *T. theileri* (39%), and *T. cruzi* (38%) (Fig. 2). Results also showed a specific B-cell epitope (LPFSISCVFASERRLARERYGISG), which presented high structural homology between *Leishmania* species but not in other trypanosomatides (Figs. 1 and 2).

| | | | |
|---|-----|--|------------------------|
| <i>L. infantum</i> (XP_003392700.1) | 1 | -MPQGQYSQKPN DGPTQPVKTRPGQNVYTG-----N-----P-----MNA PGSRPAVYYREGPWHY | 50 |
| <i>L. donovani</i> (XP_003862861.1) | 1 | -MPQGQYSQKPN DGPTQPVKTRPGQNVYTG-----N-----P-----MNA PGSRPAVYYREGPWHY | 50 |
| <i>L. major</i> (XP_001684736.1) | 1 | -MLQGQYDQKPN GGPQYNQPQGGPGQNVYTG-----N-----P-----SNP PGQS AVYYREGPWHY | 50 |
| <i>L. major</i> (XP_001684735.1) | 1 | -MLQGQYDQKPN GGPQYNQPQGGPGQNVYTG-----N-----P-----MNA PGSRPAVHSRLGNWHY | 50 |
| <i>L. mexicana</i> (XP_003877293.1) | 1 | -MQFPALYQKPKGDAPYYQPQGAQNA YNG-----N-----P-----MNA PASR SAVQNRDGLWHY | 50 |
| <i>L. braziliensis</i> (XP_001566782.1) | 1 | MHTQPQALGAPNAASQKGVPGNGADVYKTSAPPGAQWPSNDQPIPIYQRFNMLPHVKDSSQFHLQDGTI AVNRGPWHF | 79 |
| | | *: .:.*. * * | : : . *:** |
| <i>L. infantum</i> (XP_003392700.1) | 51 | SLCVCCEDMDSCEACCCFPCQVSRQCNMFMYNRREIHWPYCLLMIVFDLYL- <u>PFSSICVFASETRRLARERYGISG</u> TFG | 128 |
| <i>L. donovani</i> (XP_003862861.1) | 51 | SLCVCCEDMDSCEACCCFPCQVSRQCNMFMYNRREIHWPYCLLMIVFDLYL- <u>PFSSICIFAGETRRLARERYGISG</u> TFG | 128 |
| <i>L. major</i> (XP_001684736.1) | 51 | SLCVCCEDMDSCEACCCFSCQVSRQCNMFMYNRREIHWPYCLLMTFLDLYL- <u>FFTISWVVFGETRRLARERYGISG</u> SS | 128 |
| <i>L. major</i> (XP_001684735.1) | 51 | SLCVCCEDMDSCEACCCFPCQVSRQCNMLVSNRREIHWPYCLLMTLCDVSL <u>LFVSVTCVFASETRRLARERYGISG</u> SSG | 129 |
| <i>L. mexicana</i> (XP_003877293.1) | 51 | SLCVCCEDMDSCEACCCFPCQVSRQCNMLMNSRREIHWPYCLLMTLCDFTL <u>LFVSVSVCFASETRRLARERYGISG</u> SSS | 129 |
| <i>L. braziliensis</i> (XP_001566782.1) | 77 | SLCVCCEGIDSCCEAWCCMPCQLSRQCNMLTNNRKEIHWPYCLLMTFCDYTWLVFN <u>ASCIFASETRRLARERYGISG</u> SSS | 160 |
| | | *****: :***** ** : *******: .*:***** * * | *. : :*.*****:**.***:. |
| <i>L. infantum</i> (XP_003392700.1) | 129 | CEDFCIGYWCRTCSAQVLLLEMIVMNEFFGAMCFEAAQPQPAANRMV | 174 |
| <i>L. donovani</i> (XP_003862861.1) | 129 | CEDFCIGYWCRTCSAQVLLLEMIVMNEFFGAMCFEAAQPQPAANRMV | 174 |
| <i>L. major</i> (XP_001684736.1) | 129 | CEDFCIGYWCRTCSAQVLLLEMIVMNEFFGATCYEAAQPQPAANRMV | 174 |
| <i>L. major</i> (XP_001684735.1) | 130 | CDDCCIGYWCRTCSAQVLLLEMTAMSEFFGATCYEAAQPQPAANRMV | 175 |
| <i>L. mexicana</i> (XP_003877293.1) | 130 | LEDCCLAYWCRTCSAQVLLLEMTMNEFFGATCYEAAQPQPMGNRMV | 175 |
| <i>L. braziliensis</i> (XP_001566782.1) | 161 | CEDCCIGYFCRCPSTQVLLLEMTLMNEFFGATCYEATSHPAGRRMV | 204 |
| | | :* *:.*:** ** :***** * ***** *:**: :* ..**** | |
| | | | Similarity |
| | | | 99% |
| | | | 85% |
| | | | 80% |
| | | | 72% |
| | | | 68% |

Fig. 1. Evaluation of the amino acid sequence from amastin protein in *Leishmania*. An in silico analysis of the *L. infantum* amastin (XP_003392700.1) protein was performed by BLAST tool, where a search for structural similarity among sequences in the database of other parasite species was performed with *L. donovani* (XP_003862861.1), *L. major* (XP_001684736.1), *L. major* (XP_001684735.1), *L. mexicana* (XP_003877293.1), and *L. braziliensis* (XP_001566782.1). The amino acid sequences were aligned by the Clustal Omega program, and the specific linear Bcell epitope (marked in bold and underlined) was predicted by the ABCpred server.

| | | | |
|-------------------------------------|-----|---|-----|
| <i>L. infantum</i> (XP_003392700.1) | 0 | -----M | 01 |
| <i>T. rangeli</i> (XP_009310501.1) | 1 | -----MSAK- | 04 |
| <i>T. rangeli</i> (AGN32994.1) | 1 | -----MQVFN | 05 |
| <i>T. theileri</i> (ORC76762.1) | 1 | -----MKNTEESAEGGYSYGNPPGAVVPIGTVV-----MPTNGPTPAQPYTPLPQ--S | 49 |
| <i>T. cruzi</i> (XP_810211.1) | 1 | MELNEMRGGVYAAAQGGDSAPKWP-----GVYAAA | 32 |
| <i>T. cruzi</i> (PBJ80659.1) | 1 | MELNEMRGGVYAAAQGGDSAKWAPGVYTAAGGDSAKWPPGVYAAAQ-----GGDSAKWAPGVYTA | 66 |
| <i>T. cruzi</i> (PWU91633.1) | 1 | MELNEMRGGVYAAAQGGDSAKWAPGVYTAAGGDSAKWAPGVYTAAGGDSAKWAPGVYTA | 83 |
| | | | |
| <i>L. infantum</i> (XP_003392700.1) | 02 | PQQQYSQKPN DGPTQPVKT-----RPGQNVYTGNPMNAPGSRPAVYREGPWHSYLVCCEDMDSCEACCCFPQVSRQ | 76 |
| <i>T. rangeli</i> (XP_009310501.1) | 05 | EDGAQTSGHARG-YLAVASDEPVTGIVMENE-----VPHRLTAFDFPRDWEHDLVCCSDCQSGEAWCCFYQLSRQ | 76 |
| <i>T. rangeli</i> (AGN32994.1) | 06 | PGGDVR--YPEADIKVTGPEVRGVFMTNQFYAPPPLVTPPTMVEVQRQRDWKYDICHCCQDCSPCEAWCCFYQLSRQ | 86 |
| <i>T. theileri</i> (ORC76762.1) | 50 | EGGP-K--HGTGPQYGT-GTKHGTTGYGGSPYYGAPP-----PAQRDRWQNGLCVCCGDCSCLESWCCFYQLSRQ | 118 |
| <i>T. cruzi</i> (XP_810211.1) | 33 | QGGDSAPKWPGGVYAAAQGGDSAKWAPGVYTAAGGDSAKWPPGVYAAAQ-----GVYAAA | 109 |
| <i>T. cruzi</i> (PBJ80659.1) | 67 | QGGDSAKWAPGVYTAAGGDSAKWAPGVYTAAGGDSAKWPPGVYAAAQ-----GVYAAA | 143 |
| <i>T. cruzi</i> (PWU91633.1) | 84 | QGGDSAKWAPGVYTAAGGDSAKWAPGVYTAAGGDSAKWPPGVYAAAQ-----GVYAAA | 160 |
| | | * * * * * | |
| | | | |
| <i>L. infantum</i> (XP_003392700.1) | 77 | CNMFMYN-RREIHWFYCLLMVFDLY <u>LPFSISCVFASETRRLARERYGISGT</u> GCDFCIYWCRTCSAQQVLLMIVMNEFFG | 158 |
| <i>T. rangeli</i> (XP_009310501.1) | 77 | FNMIYKN-NPTINWFAALACAGDQCFLGVLVIFIFVVRNKVRLNLSGVLDLNDGLVLCGFCALQQSLKEMFGSGMFFG | 158 |
| <i>T. rangeli</i> (AGN32994.1) | 87 | YNMVCQRGGPTIDGMICLAAYCGDYFCGGIVSFIQCGMRTKLRNLNIRGTSFDDFCCSLCCGPTLQQSIMEMTAVGMFFG | 169 |
| <i>T. theileri</i> (ORC76762.1) | 49 | YNLLYEN-IPSNWAVAMGALLGDIYCLGLVSTVVCMLRARVRQRLSLQGSDDACMSLCCSYCSLQSLELFDAGLFFG | 200 |
| <i>T. cruzi</i> (XP_810211.1) | 110 | YNVYCDNGKPEINWLVALGSLLDGYCCFGLVSTVLQFLVRNKLRRDFNIQGSDCGDGCVVCCSHCGLQQVLMELTELGRFFG | 192 |
| <i>T. cruzi</i> (PBJ80659.1) | 144 | YNVHCDNGKPEINWLVALGSLLDGYCCFGLVSTVLHFLVRNKLRRDFNIQGSDCGDGCVVCCSPCGLQQVLMELTELGRFFG | 226 |
| <i>T. cruzi</i> (PWU91633.1) | 161 | YNVHCDNGKPEINWLVALGSLLDGYCCFGLVSTVLHFLVRNKLRRDFNIQGSDCGDGCVVCCSPCGLQQVLMELTELGRFFG | 243 |
| | | * * * * * | |
| | | | |
| <i>L. infantum</i> (XP_003392700.1) | 159 | AMCFEAAQPAAANRMV | 174 |
| <i>T. rangeli</i> (XP_009310501.1) | 159 | ACCYDIPHAVRMR--- | 171 |
| <i>T. rangeli</i> (AGN32994.1) | 170 | ACCYEAPPGFVAMQ-- | 183 |
| <i>T. theileri</i> (ORC76762.1) | 201 | ACCYNKAPGSRIME-- | 214 |
| <i>T. cruzi</i> (XP_810211.1) | 193 | ACCYDAPPFVVMQ-- | 206 |
| <i>T. cruzi</i> (PBJ80659.1) | 127 | ACCYDAPPFVVMQ-- | 240 |
| <i>T. cruzi</i> (PWU91633.1) | 144 | ACCYDAPPFVVMQ-- | 257 |
| | | ** * : : | |
| | | Similarity | |

Fig. 2. Evaluation of the amino acid sequence from amastin protein in other trypanosomatides. An in silico analysis of the *L. infantum* amastin (XP_003392700.1) protein was performed by the BLAST tool, and the search for structural similarity among protein sequences expressed in other trypanosomatides was performed: *T. rangeli* (XP_009310501.1), *T. rangeli* (AGN32994.1), *T. theileri* (ORC76762.1), *T. cruzi* (XP_810211.1), *T. cruzi* (PBJ80659.1), and *T. cruzi* (PWU91633.1). The amino acid sequences were aligned by the Clustal Omega program, and the *Leishmania*-specific B-cell epitope is shown (marked in bold and underlined).

3.2. Evaluation of the antigens for the serodiagnosis of canine VL

Serological assays were performed using the recombinant protein and the synthetic peptide, with *L. infantum* SLA and the rA2 protein used as controls. Results showed that symptomatic and asymptomatic CVL sera reacted with the amastin protein and synthetic peptide, with OD values significantly higher when compared to those found using rA2 or SLA (Fig. 3).

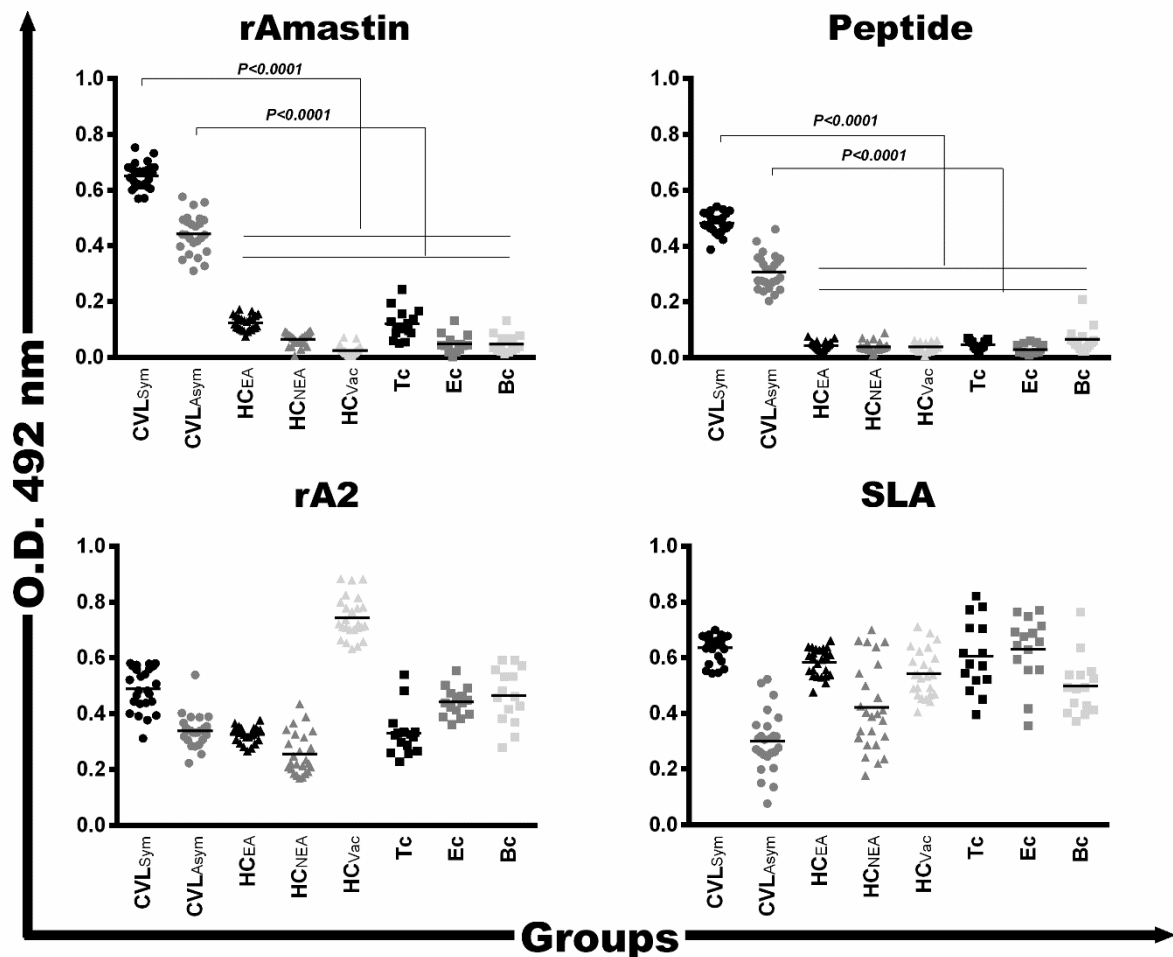


Fig. 3. ELISA reactivity using the antigens against canine sera. ELISAs were performed using sera samples from asymptomatic (CVLSym, $n = 25$) and symptomatic (CVLAsym, $n = 25$) visceral leishmaniasis dogs, as well as sera from healthy dogs living in an endemic (HCEA, $n = 25$) or nonendemic (HCNEA, $n = 25$) area of leishmaniasis; samples from healthy animals and vaccinated with the Leish-Tec® vaccine (HCVac, $n = 25$) and from those infected with *Trypanosoma cruzi* (Tc, $n = 15$), *Ehrlichia canis* (Ec, $n = 15$), or *Babesia canis* (Bc, $n = 15$). The individual OD values for each sample against the recombinant amastin protein, synthetic peptide, rA2, and *L. infantum* SLA are shown. The mean of each group is indicated, as well as significant differences between CVL and the other groups ($P < 0.0001$).

ROC curves were constructed, and the maximum sensitivity and specificity values were found for the protein and peptide, with an AUC of 1.0, whereas when using rA2, the AUC value was 0.55 to discriminate CVL sera from healthy controls (HC) and 0.50 to discriminate between CVL sera and cross-reactive disease sera (CRD, comprised of vaccinated animals and those infected with *E. canis*, *Babesia canis*, or *T. cruzi*) (Fig. 4). Using *L. infantum* SLA, AUC values were 0.53 and 0.65 to discriminate CVL sera from HC and CRD samples, respectively.

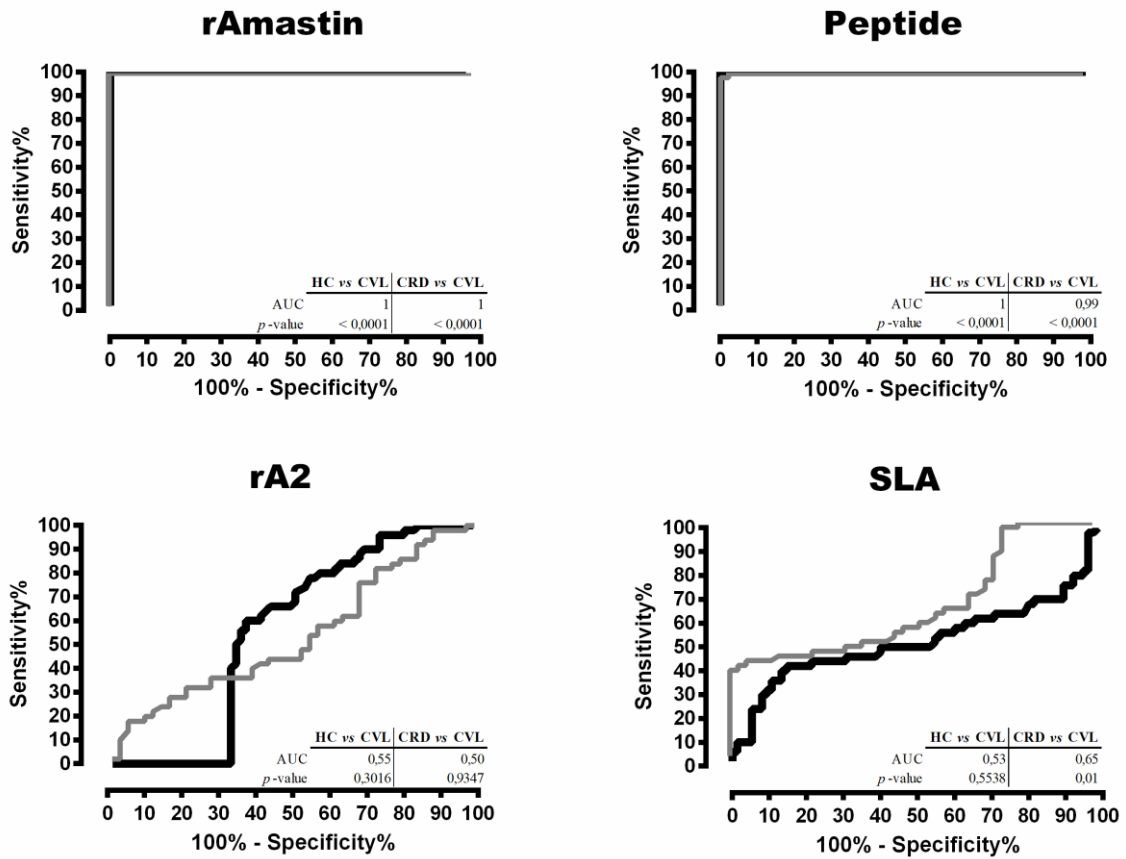


Fig. 4. ROC curves for the diagnosis of canine leishmaniasis. ROC curves were constructed with the results obtained in the ELISAs with the canine serological panel against the amastin protein, synthetic peptide, rA2, and *L. infantum* SLA. The sensitivity (95% CI), specificity (95% CI), and AUC values were determined and are shown.

Regarding the sensitivity and specificity values, the recombinant protein and synthetic peptide showed results of 100% in both cases, whereas when using rA2 or SLA, the sensitivity values were of 78.0% and 42.0% to discriminate positive and negative samples, respectively, and specificity values were of 45.3% and 75.3%, respectively (Table 1).

Table 1: Evaluation of the antigens for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. Sera samples from asymptomatic and symptomatic visceral leishmaniasis dogs, as well as from healthy dogs living in endemic or nonendemic areas of leishmaniasis; samples from healthy animals but immunized with the Leish-Tec® vaccine; and sera from those infected with *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, or *Babesia canis* were used in the assays. ROC curves were constructed to determine the cutoff values of the antigens. The sensitivity (Se; 95% CI), specificity (Sp; 95% CI), and Youden index (J) were calculated between the CVL (asymptomatic plus symptomatic cases) and HC (healthy animals) groups, as well as between CVL (asymptomatic plus symptomatic cases) and CRD (cross-reactive diseases) groups.

Table 1.

| Antigen | CVL <i>versus</i> HC | | | | | | CVL <i>versus</i> CRD | | | | | |
|----------|----------------------|------|-----------|------|-----------|------|-----------------------|------|-----------|------|-----------|------|
| | Cut-off | Se | 95%CI | Sp | 95%CI | J | Cut-off | Se | 95%CI | Sp | 95%CI | J |
| rAmastin | >0.2405 | 100 | 92.9-100 | 100 | 95.2-100 | 1.00 | >0.2770 | 100 | 92.9-100 | 100 | 92,13-100 | 1.00 |
| Peptide | >0.1455 | 100 | 92.9-100 | 100 | 95.2-100 | 1.00 | >0.2170 | 98.0 | 89.4-100 | 100 | 92,13-100 | 0.98 |
| rA2 | >0.3328 | 78.0 | 64.0-88.5 | 45.3 | 33.8-57.3 | 0.23 | >0.5573 | 16.0 | 7.2- 29.1 | 73.3 | 81.7-92.3 | 0.09 |
| SLA | <0.3870 | 42.0 | 28.2-56.8 | 75.3 | 65.3-89.4 | 0.27 | <0.3550 | 38.0 | 24.7-52.8 | 68.8 | 55.6-89.9 | 0.38 |

3.3. Testing the antigens for the serodiagnosis of human VL

The recombinant amastin protein and synthetic peptide were also evaluated in ELISA experiments for the diagnosis of human disease. For this, the rA2 protein and *L. infantum* SLA were also used as controls. Results showed that both protein and peptide presented both sensitivity and specificity values of 100%, respectively, with an AUC of 1.0 to identify *L. infantum*–infected patients, whereas when using *L. infantum* SLA and rA2, the sensitivity values were 86.67% and 100%, respectively, with an AUC of 0.84 and 0.91, respectively, and specificity values were 73.33% and 75.00%, respectively (Fig. 5).

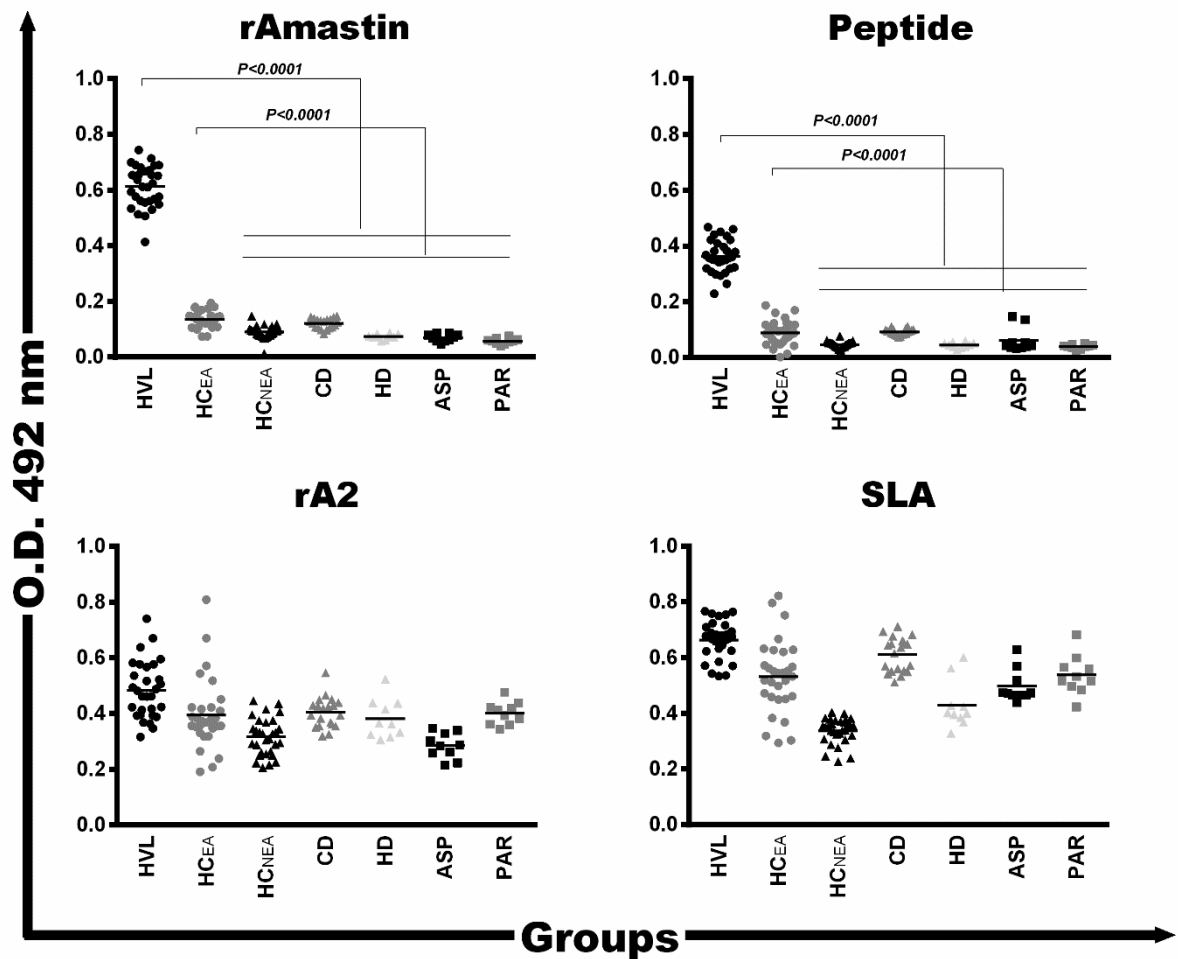


Fig. 5. Diagnostic evaluation of the antigens to detect human leishmaniasis. ELISAs were performed using sera samples from visceral leishmaniasis patients (VL, $n = 30$), from noninfected subjects living in endemic (HEA, $n = 30$) or nonendemic (HNEA, $n = 15$) regions of disease, as well as from patients with Chagas disease (CD, $n = 20$), leprosy (HAN, $n = 10$), aspergillosis (ASP, $n = 10$), or paracoccidioidomycosis (PAR, $n = 10$). The individual OD values for each sample against the recombinant amastin protein, synthetic peptide, rA2, and *L. infantum* SLA are shown. The mean of each group is indicated, as well as significant differences between HVL and the other groups ($P < 0.0001$).

ROC curves were also constructed, and results are shown in Fig. 6.

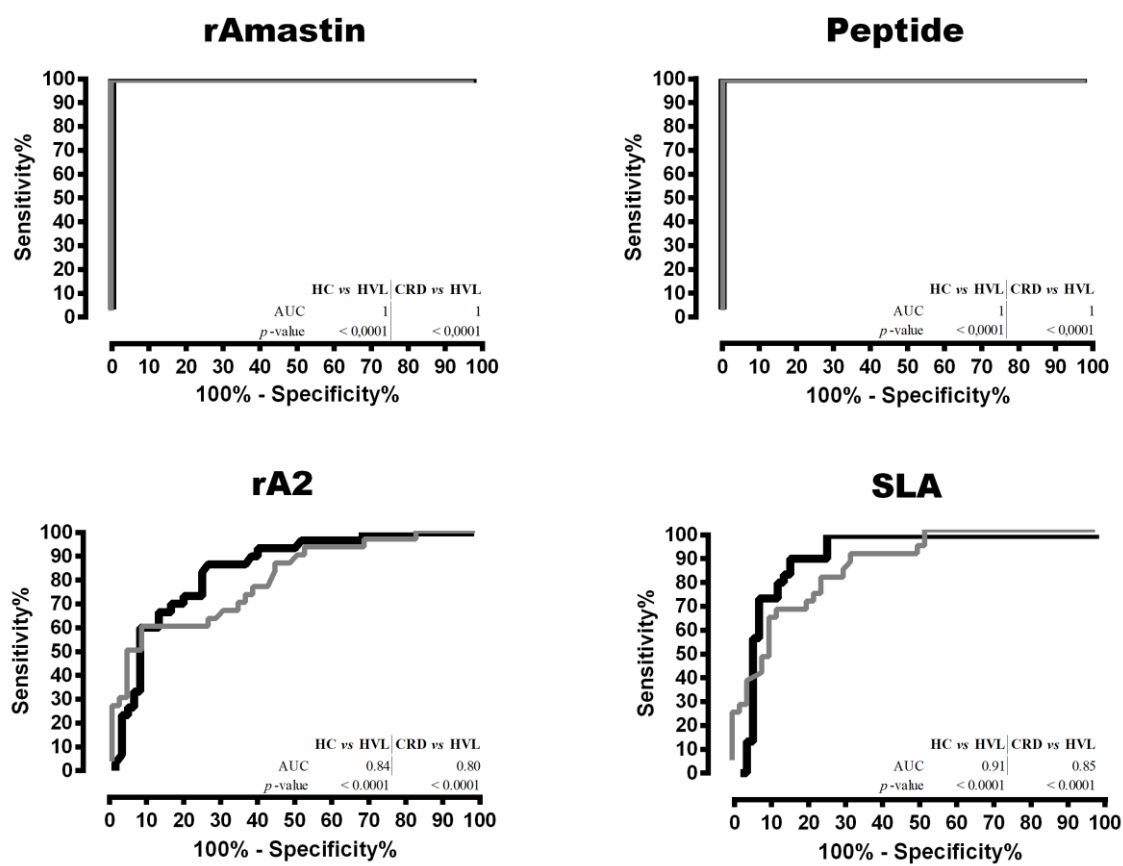


Fig. 6. ROC curves for the diagnosis of human leishmaniasis. ROC curves were constructed with the results obtained in the ELISAs with the human serological panel against the amastin protein, synthetic peptide, rA2, and *L. infantum* SLA. The sensitivity (95% CI), specificity (95% CI), and AUC values were determined and are shown.

Parameters used to evaluate the diagnostic efficacy of the recombinant protein and synthetic peptide are also shown (Table 2).

Table 2: Evaluation of the antigens for the serodiagnosis of human leishmaniasis. A human serological panel comprised of sera samples from healthy individuals living in endemic or nonendemic areas of VL, as well as from VL, Chagas disease, paracoccidioidomycosis, leprosy, and aspergillosis patients, was used in ELISA experiments against the amastin protein and synthetic peptide. The rA2 protein and *L. infantum* SLA were used as controls. Results obtained were used to calculate sensitivity, specificity, 95% CI, AUC, and Youden index (J).

Table 2.

| Antigen | HVL versus HC | | | | | | HVL versus CRD | | | | | |
|----------|---------------|-------|-------------|-------|-------------|------|----------------|-------|-------------|-------|-------------|------|
| | Cut-off | Se | 95%CI | Sp | 95%CI | J | Cut-off | Se | 95%CI | Sp | 95%CI | J |
| rAmastin | >0.3043 | 100 | 88.43-100 | 100 | 94.04-100 | 1.00 | >0.2805 | 100 | 88.43-100 | 100 | 92.89-100 | 1.00 |
| Peptide | >0.2079 | 100 | 88.43-100 | 100 | 94.04-100 | 1.00 | >0.1880 | 100 | 88.43-100 | 100 | 92.89-100 | 1.00 |
| rA2 | >0.3860 | 86.67 | 69.28-96.24 | 73.33 | 60.34-83.93 | 0.60 | >0.4558 | 60.00 | 40.60-77.34 | 92.00 | 80.77-97.78 | 0.52 |
| SLA | >0.5333 | 100 | 88.43-100 | 75.00 | 62.14-85.28 | 0.75 | >0.5703 | 90.00 | 73.47-97.89 | 68.00 | 53.30-80.48 | 0.58 |

3.4. Cell response generated in human PBMCs

The stimulation of human PBMC with the amastin protein was also performed. For this, cells derived from blood samples of VL patients were collected before and after treatment, and were stimulated with the recombinant protein. As a control, cells were also obtained from healthy subjects living in an endemic area of VL. After, the IFN- γ and IL-10 production was measured in the cell culture supernatants. Results showed higher amastin-specific IFN- γ levels in treated VL patients and healthy subjects, which were associated with lower IL-10 production in these groups (Fig. 7). On the other hand, when *L. infantum* SLA was used as a stimulus, higher IL-10 levels were found in the untreated patient group.

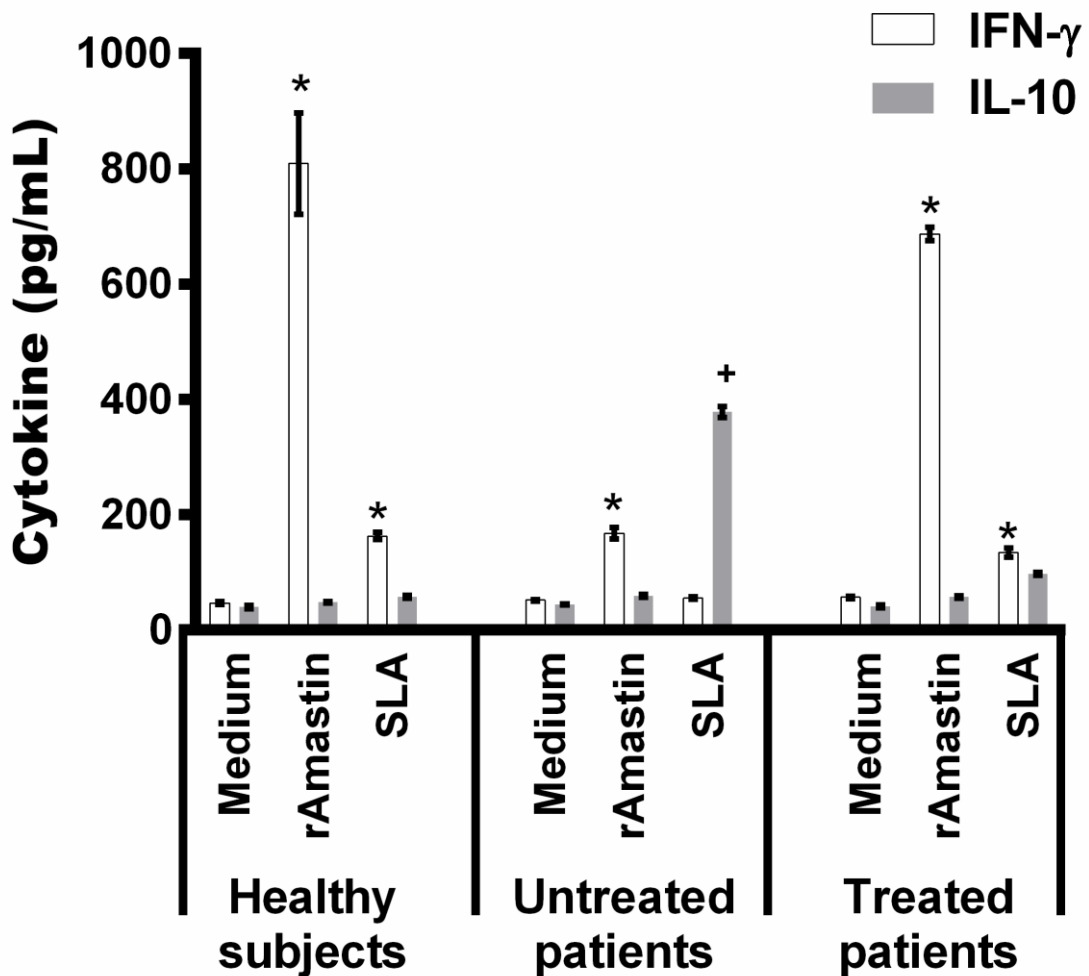


Fig. 7. Immunogenicity in PBMCs from untreated and treated VL patients. To evaluate the immunogenicity in human PBMCs from untreated and treated visceral leishmaniasis patients (n = 6 each), as well as from healthy subjects living in an endemic region of disease (n = 6), cells (10⁶) were plated in 48-well flat-bottomed tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA) and either incubated alone

(medium) or stimulated with the amastin protein or SLA (10.0 and 25.0 µg/mL, respectively) for 5 days at 37 °C in 5% CO₂. Supernatants were collected, and IFN-γ and IL-10 production was evaluated by ELISA capture (Human IFN-γ and IL-10 ELISA Sets, BD Biosciences, USA) according to manufacturer's instructions. Bars indicate the mean ± standard deviation of the groups. *Statistically significant difference in relation to the SLA stimulus (P < 0.0001). +Statistically significant difference in relation to the rAmastin stimulus (P < 0.0001).

4. Discussion

Amastins comprise a glycoproteins family encoded by trypanosomatides genes. In spite of descriptions of this protein family in distinct *Leishmania* species, a biological role of these proteins has not yet been established (Azizi *et al.* 2009). In the present work, the *L. infantum* amastin protein was cloned and evaluated as antigenic and immunogenic in the canine and human VL. Due to the fact that this protein was recently identified in an immunoproteomics study developed in *L. infantum* amastigote extracts by antibodies in sera of asymptomatic and symptomatic VL dogs (Coelho *et al.* 2012), its recombinant version was evaluated for the serodiagnosis of the disease. A preliminary study was also conducted to evaluate the immunogenicity of this protein by using PBMC cultures stimulated with the protein, which were derived from treated or nontreated VL patients as well as from healthy subjects.

The success of the serological diagnosis of VL is related to the sensitivity and specificity of the tests employed in this study, and their performance depends on many factors, such as infection status and the type of diagnostic antigen (Travi *et al.* 2018). In this context, when the infection by the parasite is considered subclinical or asymptomatic, the sensitivity of the tests presents variable results (Carvalho *et al.* 2017; Nogueira *et al.* 2018). This fact can be due mainly to the low titers of antileishmanial antibodies found in these infected hosts (Mettler *et al.* 2005). On the other hand, the nature of the antigen is also important since most of them are present in the promastigote forms of the parasites (Pineiro *et al.* 2009). The difficulty in cultivating axenic amastigotes, as well as the low degree of purification of these forms, can be considered limiting factors in the identification of specific antigens. On the other hand, these molecules should be considered as suitable targets to compose a diagnostic test since just a few hours after the infection, as well as during the active disease, amastigotes can already be found circulating in infected mammalian hosts (Fernandes *et al.* 2012).

Since amastin proteins are considered to be transmembrane glycoproteins documented as present in *Leishmania* amastigotes, they could be considered for the

serodiagnosis of canine and human disease. Rafati *et al.* (2006) evaluated an amastin-derived peptide as a biomarker for the diagnosis of human VL. Results showed that amastin-specific antibodies were present in VL patient sera, with a 95% reactivity. The authors suggested that this molecule could be considered a serological marker for human disease. In the present study, the recombinant amastin protein also showed high sensitivity and specificity values to detect VL patients, thus allowing one to infer about the biological role of this antigen in the identification of *L. infantum*-infected humans.

The production of recombinant proteins by cloning and heterologous expression in prokaryotic systems represents a relevant, but costly, alternative to preparing large amounts of purified antigens (ChávezFumagalli *et al.* 2013; Florez *et al.* 2017). By contrast, synthetic peptides, predicted as specific B-cell epitopes, could be considered since they are simpler, more stable, and less costly to produce than the recombinant proteins (Menezes-Souza *et al.* 2015; Noya *et al.* 2003). Amastins can be found conserved in distinct *Leishmania spp.* (Jackson 2010); as a consequence, a B-cell epitope was predicted to have a high structural homology between distinct parasite species but also presents a low homology when amino acid sequences from other trypanosomatides are evaluated. The synthesized epitope was tested for the serodiagnosis of VL, and results showed high sensitivity and specificity values to identify positive but not negative or cross-reactive sera, thus demonstrating the feasibility to use this molecule, when compared to the recombinant protein, for the serodiagnosis of the disease.

To the best of our knowledge, the present study is the first of its kind to evaluate the diagnostic role of both the amastin protein and a conserved and linear B-cell epitope for the serodiagnosis of CVL, as well as a possible immunological marker for human disease. The protein was also tested by using a cohort of Brazilian VL cases, and results corroborated those obtained by Rafati *et al.* (2006) using a cohort based on Iranian patient sera. On the other hand, although A2 proteins have also proven to be specific of *Leishmania* amastigotes (Resende *et al.* 2008) and used in some studies for the serodiagnosis of canine and human disease (Akhoundi *et al.* 2013; Carvalho *et al.* 2002; Porrozzini *et al.* 2007), results obtained here showed worst sensitivity and specificity values when compared to the recombinant amastin protein used to identify both canine and human VL cases.

Some studies have used amastin proteins as vaccine candidates against trypanosomatids, such as *T. cruzi* (Minning *et al.* 2003; Teixeira *et al.* 1994) and *L. major* (Stober *et al.* 2006); however, there is a need to perform new studies to stimulate immune cells that come from sources other than those derived from mice. It is well known that, during active VL, a depressed cell-mediated immune response, characterized by the failure of patients' PBMCs to respond when stimulated by *Leishmania* antigens, is commonly found, and the production of cytokines, such as IFN- γ and IL-12, is hampered (Peruhype-Magalhães *et al.* 2005). On the other hand, when PBMCs from cured and/or treated patients are stimulated, they produce higher levels of proinflammatory cytokines (Singh *et al.* 2012). Here, PBMCs collected from untreated and treated VL patients were in vitro stimulated with the amastin protein, and IFN- γ and IL-10 production was measured in the cell culture supernatant. Our findings showed a significant IFN- γ response in treated patients when compared to the IL-10 levels. In addition, higher levels of IFN- were also found in healthy subjects living in an endemic region of disease. In fact, new studies are warranted, especially those using immune cells collected from a larger number of patients and controls; however, results obtained here suggest the occurrence of an immunogenic action based on the Th1 profile when cells from both patients and controls were stimulated with the amastin protein, opening the possibility of testing this protein in other more controlled studies against human VL.

In addition, the absence of a higher serological panel, as well as of other diagnostic platforms to test both the recombinant protein and synthetic peptides, could also be considered limiting factors of our study. However, the results presented here suggest that amastin can be considered a candidate for the serodiagnosis of canine and human VL, and suggest an immunogen role of this protein when it was used to stimulate immune cells derived from VL patients and healthy individuals.

Conflict of interest

The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like thank to CAPES, CNPq, and FAPEMIG for the scholarships. This work was supported by grants from CNPq (APQ-408675/2018-7).

References

- Akhoundi B, Mohebali M, Shojaee S, Jalali M, Kazemi B, Bandehpour M, *et al.* Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol* 2013;133:307-13.
- Almeida-Leal GG, Roatt BM, Oliveira Aguiar-Soares RD, Carneiro CM, Giunchetti RC, *et al.* Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 2014;205:472-82.
- Azizi H, Hassani K, Taslimi Y, Najafabadi HS, Papadopoulou B, Rafati S. Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. *Parasitology* 2009;136:723-35.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet* 2018;392:951-70.
- Carvalho FA, Charest H, Tavares CA, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, *et al.* Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:289-95.
- Carvalho AMRS, Costa LE, Salles BCS, Santos TTO, Ramos FF, Lima MP, *et al.* An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. *Cell Immunol* 2017;318:42-8.
- Chaabouni A, Boubaker Elandoulsi R, Mhadhbi M, Gharbi M, Sassi A. Comparative analysis of the *Leishmania infantum*-specific antibody repertoires and the autoantibody repertoires between asymptomatic and symptomatic dogs. *Vet Parasitol* 2018;261:9-17.
- Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Testacicca MC, Lage DP, Costa LE, Lage PS, *et al.* Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20:835-41.
- Coelho EAF, Tavares CAP, Carvalho FAA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, *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. *Infect Immun* 2003;71:3988-94.
- Coelho VTS, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, *et al.* Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1430.
- Dias DS, Martins VT, Ribeiro PAF, Ramos FF, Lage DP, Tavares GSV, *et al.* Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of a conserved *Leishmania* hypothetical protein against visceral leishmaniasis. *Parasitology* 2017;8:1-12.
- Doyle PS, Engel JC, Pimenta PFP, Silva PP, Dwyer DM. *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37°C. *Exp Parasitol* 1991;73:326-34.

- Duthie MS, Lison A, Courtenay O. Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2018;34:881-90.
- Farahmand M, Nahrevanian H. Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. *Iran Biomed J* 2016;20:128-34.
- Fernandes AP, Coelho EAF, Machado-Coelho GLL, Grimaldi JrG, Gazzinelli RT. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Curr Opin Microbiol* 2012;15:1-10.
- Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, *et al.* Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007;146:235-41.
- Florez MM, Oliveira CI, Puerta C, Guzman F, Ayala M, Montoya G, *et al.* Synthetic peptides derived from ribosomal proteins of *Leishmania spp.* in mucocutaneous leishmaniasis: diagnostic usefulness. *Protein Pept Lett* 2017;24:982-8.
- Gish W, States DJ. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* 1993;3:266-72.
- Jackson AP. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. *Mol Biol Evol* 2010;27:33-45.
- Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Garde E, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, *et al.* Prophylactic properties of a *Leishmania*-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2015;37:646-56.
- Magalhães FB, Castro-Neto AL, Nascimento MB, Santos WJT, Medeiros ZM, Neto ASL, *et al.* Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS One* 2017;12:e0184867.
- Maia CS, Monteiro MC, Gavioli EC, Oliveira FR, Oliveira GB, Romão PR. Neurological disease in human and canine leishmaniasis: clinical features and immunopathogenesis. *Parasite Immunol* 2015;37:385-93.
- Mendonça DVC, Lage DP, Calixto SL, Ottoni FM, Tavares GSV, Ludolf F, *et al.* Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. *Parasitol Res* 2018;117:391-403.
- Menezes-Souza D, Mendes TAO, Leão ACA, Gomes MS, Fujiwara RT, Bartholomeu DC. Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from *Leishmania braziliensis*: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:1323-36.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 2005;43:5515-9.

- Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop* 2011;119: 69-75.
- Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGraw RA, Tarleton RL. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;131:55-64.
- Monteiro FM, Machado AS, Rocha-Silva F, Assunção CB, Graciele-Melo C, Costa LE, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: detection of *Leishmania spp.* genome in peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). *Microb Pathog* 2018;126:263-8.
- Nogueira CT, Cistia MLD, Urbaczek AC, Jusi MM, Velásquez AMA, Machado RZ, *et al.* Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018;113:197-201.
- Noya O, Patarroyo ME, Guzmán F, Alarcón de Noya B. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Curr Protein Pept Sci* 2003;4:299-308.
- Nunes CM, Lima VM, Melo GD, Paula HB, Pereira ME, Tronco CM, *et al.* Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniasis diagnosis in a longitudinal study. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015;24:402-9.
- Nunes JB, Coura-Vital W, Colombo FA, Baêta FJM, Pinheiro AC, Roatt BM, *et al.* Comparative analysis of real-time PCR assays in the detection of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2018;117:3341-46.
- Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LA, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, *et al.* Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. *Scand J Immunol* 2005;62:487-95.
- Pinheiro PH, Pinheiro AN, Ferreira JH, Costa FA, Katz S, Barbiéri CL. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009;162:32-9.
- Porrozzi R, Costa MVS, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, Santos CD, *et al.* Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:544-8.
- Rafati S, Hassani N, Taslimi Y, Movassagh H, Rochette A, Papadopoulou B. Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1104-10.
- Resende DM, Caetano BC, Dutra MS, Penido ML, Abrantes CF, Verly RM, *et al.* Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells. *Vaccine* 2008;26:4585-93.
- Saha S, Raghava GPS. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 2006;65:40-8.

- Salles BCS, Dias DS, Steiner BT, Lage DP, Ramos FF, Ribeiro PAF, *et al.* Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. *Immunobiology* 2019;224:163-71.
- Santos RCD, Pinho FA, Passos GP, Larangeira DF, Barrouin-Melo SM. Isolation of naturally infecting *Leishmania infantum* from canine samples in Novy-MacNeal-Nicolle medium prepared with defibrinated blood from different animal species. *Vet Parasitol* 2018;257:10-4.
- Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 2015;9:588-96.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 2011;7:539.
- Singh OP, Stober CB, Singh AK, Blackwell JM, Sundar S. Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1874.
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2011;4:86.
- Solcà MS, Bastos LA, Guedes CE, Bordoni M, Borja LS, Larangeira DF, *et al.* Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS One* 2014;9:e103635.
- Souza-Filho JA, Barbosa JR, Figueiredo FB, Mendes AA Júnior, Silva SR, *et al.* Performance of Alere™ immunochromatographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2016;225:114-6.
- Stober CB, Lange UG, Roberts MT, Gilmartin B, Francis R, Almeida R, *et al.* From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. *Vaccine* 2006;24:2602-16.
- Subramanian A, Sarkar RR. Perspectives on *Leishmania* species and stage-specific adaptive mechanisms. *Trends Parasitol* 2018;34:1068-81.
- Sundar S, Singh OP. Molecular diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mol. Diagn. Ther* 2018;22:443-57.
- Teixeira SM, Russell DG, Kirchhoff LV, Donelson JE. A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J Biol Chem* 1994;269:20509-16.
- Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:e0006082.
- World Health Organization. Leishmaniasis. 2016. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>

Zhang WW, Charest H, Ghedin E, Matlashewski G. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol 1996;78:79-90.

6. CONCLUSÃO

A proteína recombinante Amastina e seu epítipo específico de células B mostraram elevados valores de especificidade e sensibilidade para a detecção da LV em cães e no homem, com baixa reatividade cruzada com amostras sorológicas de outros grupos; então se colocando como candidatos ao diagnóstico laboratorial da doença em ambos os hospedeiros mamíferos.

7. PERSPECTIVAS

⇒ Avaliar os antígenos contra um maior número de soros e em estudos de coorte em áreas endêmicas;

⇒ Testar os antígenos em outras plataformas diagnósticas, como em testes imunocromatográficos rápidos, a fim de possibilitar seu uso no campo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.R.; VERSTEEG, I.; LEEFLANG, M.M.G. Systematic Review into Diagnostics for Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Journal of Tropical Medicine**. 2013.

ADEGBOYE, M.A.; OLUMOH, J.; SAFFARY, T.; ELFAKI, F.; ADEGBOYE, O. Effects of time-lagged meteorological variables on attributable risk of leishmaniasis in central region of Afghanistan. **Science of the Total Environment**. 685, p. 533–541. 2019.

AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTYPKA, J.; KUHL, K.; LUKES, J.; CANNET, A.; RAVEL, C.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KASBARI, M.; GRANOULLAC, B.; GRADONI, L.; SERENO, D. *Leishmania* Infections: Molecular Targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 56, p. 1-29. 2017.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.D.; The WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One**. v. 7, n.5. 2012.

ARIAS, J.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Euro. Infect. Dis.** v. 2, p. 145-146. 1996.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D.JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**. v. 154, n. 6, p. 1003-11. 1986.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**. v. 24, n. 7, p. 324–330. 2008.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Scienc Direct**. v. 37, p. 1097-1106. 2007.

BOARINO, A.; SCALONE, A.; L. GRADONI; FERROGLIO, E.; VITALE, F.; ZANATTA, R.; GIUFFRIDA, M.G.; ROSATI, S. Development of Recombinant Chimeric Antigen Expressing Immunodominant B Epitopes of *Leishmania infantum* for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**.v. 12, n. 5, p. 647- 653. 2005.

BOELAERT, M.; BHATTACHARYA, S.; CHAPPUIS, F.; EL SAFI, S.H.; HAILU, A.; MONDAL, D.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; WASUNNA, M.; PEELING, R.W. Avaliação de testes diagnósticos rápidos: leishmaniose visceral. **Nat Rev Microbiol**. v. 5, p. 30-39. 2007.

CHAABOUNI, A.; ELANDOULSI, R.B.; MHADHBI, M.; GHARBY, M.; SASSI, A. Comparative analysis of the *Leishmania infantum*-specific antibody repertoires and the autoantibody repertoires between asymptomatic and diseased dogs. **Veterinary Parasitology**. 2018.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.;ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**. v. 5. 2007.

COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.P.; CARVALHO, F.A.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; *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. **Infect Immun.** 71, p. 3988-94. 2003.

COELHO, E.A.; RAMÍREZ, L.; COSTA, M.A.; COELHO, V.T.; MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; OLIVEIRA, D.M.; TAVARES, C.A.; BONAY, P.; NIETO, C.G.; ABÁNADES, D.R.; ALONSO, C.; SOTO, M. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. **Clin Vaccine Immunol.** v. 16, n. 12, p. 1774-80. 2009.

COELHO, V.T.; OLIVEIRA, J.S.; VALADARES, D.G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; DUARTE, M.C.; LAGE, P.S.; SOTO, M.; SANTORO, M.M.; TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 6, n. 1, p. e1430. 2012.

COELHO, E.A.F.; COSTA, L.E.; LAGE, D.P.; MARTINS, V.T.; GARDE, E.; PEREIRA, N.C.J.; LOPES, E.G.P.; BORGES, L.F.N.M.; DUARTE, M.C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology.** 215, p. 63–71. 2016.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 44, n. 2, p. 232-242. 2011.

COSTA, M.M.; PENIDO, M.; DOS SANTOS, M.S.; DORO, D.; FREITAS, E.; MICHALICK, M.S.; GRIMALDI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS Negl Trop Dis.** 6(5):e1622. 2012.

CROFT SL, COOMBS GH. Leishmaniasis: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.** v. 19, n.11, p. 502-508. 2003.

CUNNINGHAM, J.; HASKER, E.; DAS, P.; EL SAfi, S.; GOTO, H.; MONDAL, D.; MBUCHI, M.; MUKHTAR, M.; RABELLO, A.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; WASUNNA, M.; ADAMS, E.; MENTEN, J.; PEELING, R. A Global Comparative Evaluation of Commercial Immunochromatographic Rapid Diagnostic Tests for Visceral Leishmaniasis. **Evaluation of Visceral Leishmaniasis** . p. 1312 – 1319. 2012.

DA SILVA, M.R.B.; BRANDÃO, N.A.A.; COLOVATI, M.; DE SOUSA, M.M.P.; DE LIMA, L.C.; DORTA, M.L.; RIBEIRO-DIAS, F.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N.; DE OLIVEIRA, M.A.P. Performance of two immunochromatographic tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV. **Parasitology Research.** v. 117, p. 419-427. 2017.

DANESHOD, Y.; ORYAN, A.; DAVARMANESH, M.; SHIRIAN, S.; NEGAHBAN, S.; ALEDAVOOD, A.; DAVARPANAH, M.A.; SOLEIMANPOOR, H; DANESHOD, K. Clinical, Histopathologic, and Cytologic Diagnosis of Mucosal Leishmaniasis and Literature Review. **Arch Pathol Lab Med.** v. 135. 2011.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet Parasitol.** v. 10, p. 139-46. 2007.

DEBORGGRAEVE, S.; LAURENT, T.; ESPINOSA, D.; AUWERA, G.V.D.; MBUCHI, M.; WASUNNA, M.; EL-SAFI, S.; AL-BASHEER, A.A.; ARÉVALO, J.; MIRANDA-VERÁSTEGUI, C.; LECLIPTEUX, T.; MERTENS, P.; DUJARDIN, J.C.; HERDEWIJN, P.; BÜSCHER, P. A Simplified and Standardized Polymerase Chain Reaction Format for the Diagnosis of Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases.** p. 1565 - 1572. 2008.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* v. 27, p. 305-18. 2004.

DIAS, D.S.; RIBEIRO, A.F.; MARTINS, V.T.; LAGE, D.P.; RAMOS, F.F.; DIAS, A.L.T.; RODRIGUES, M.R.; PORTELA, A.S.B.; COSTA, L.E.; CALIGIORNE, R.B.; STEINER, B.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; SALLES, B.C.S.; SANTOS, T.T.O.; SILVEIRA, J.A.G; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; ROATT, B.R.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; COELHO, E.A.F. Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. **Cellular Immunology.** v. 323, p. 59 - 69. 2018.

DIRO, E.; YANSOUNI, C.P.; TAKELE, Y.; MENGESHA, B.; LYNEN, L.; HAILU, A.; GRIENSVEN, J.; BOELAERT, M.; BUSCHER, P. Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood Microscopy in Ethiopia: A Prospective Phase-III Study of the Diagnostic Performance of Different Concentration Techniques Compared to Tissue Aspiration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**v. 96. n. 1, p. 190-196. 2017.

DOYLE, P.S.; ENGEL, J.C.; PIMENTA, P.F.P.; SILVA, P.P.; DWYER, D.M. *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37°C. **Exp Parasitol.** 73, p.:326-34. 1991.

DUARTE, M.C.; PIMENTA, D.C.; MENEZES-SOUZA, D.; MAGALHÃES, R.D.M.; DINIZ, J.L.C.P.; COSTA, L.E.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LAGE, P.S.; BARTHTOLOMEU, D.C.; ALVES, J.M.; FERNANDES, P.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; GONÇALVES, D.U.; ROCHA, M.O.C.; COELHO, A.F. Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol** 22:1187-1196. 2015.

DUPÉ, A.; DUMAS, C.; PAPADOPOULOU, B. An Alba-domain protein contributes to the stage-regulated stability of amastin transcripts in *Leishmania*. **Molecular Microbiology.** v. 91, n. 3, p. 548–561. 2014.

DUPREY, Z. H.; STEURER, F.J.; ROONEY, J.A.; KIRCHHOFF, L.V.; JACKSON, J.E.; ROWTON, E.D.; SCHANTZ, P.M. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. **Emerging infectious diseases,** v. 12, n. 3, p. 440. 2006.

ESPIR, T.T.; GUERREIRO, T.S.; NAIFF, M. F.; FIGUEIRA, L.P.; SOARES, F.V.; DA SILVA, S.S.; FRANCO, A.M. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology**. n. 167, p. 1-6. 2016.

ELMAHALLAWY, E.K.; MARTINEZ, A.S.; RODRIGUES-GRANGER, J.; HOYOSMALLECOT, Y.; AGIL, A.; MARI, J.M.N.; FERNANDEZ, J.G. Diagnosis of leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries** v. 8, p. 961- 972. 2014.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato. **Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.** 2004.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M.M.; COELHO, E.A.; MICHALICK, MS.; DE FREITAS, E.; MELO, M.N.; LUIZ TAFURI, W.; RESENDE, M.; HERMONTI, V.; ABRANTES, C.F.; GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895. 2008.

FERREIRA, I.P.S; PEIXOTO, H.M.; ROMERO, G.A.F; OLIVEIRA, M.R.F. Cost of visceral leishmaniasis care in Brazil. **Tropical Medicine and International Health**. v.22, n.12, p. 579-589. 2017.

FIEVEZ, A.M.C.; SILVA-FREITAS, M.L.; QUEIROS-SOUSA, A.; SANTOS-OLIVEIRA, J.R.; DA-CRUZ, A.M. Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. **PLoS One**. v. 14. n. 3. e. e0214413. 2019.

GAMA, M.E.; COSTA, J.M.; GOMES, C.M.; CORBETT, C.E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 99, n. 8, p. 889-93. 2004.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int J Parasitol**. v. 35, n.11-12, p. 1169-80. 2005.

GRIENSVEN, J.V.; DIRO. E. Visceral Leishmaniasis. **Infect Dis Clin N Am**. V. 28, p. 309-322. 2012.

GRIENSVEN, J.V.; DIRO. E. Visceral Leishmaniasis Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infect Dis Clin**. v. 33, p. 79-99. 2019.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**. v. 6, n. 3, p. 230-250. 1993.

GRIMALDI, G.Jr.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I.D.; AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 106, n. 1, p. 54-9. 2012.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n. 1, p. 71-80. 2003.

GOTO, H.; PRIANTI, M.G. Immunoactivation And Immunopathogeny During Active Visceral Leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** .v. 51, n. 5, p. 241-246. 2009.

- GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 8, p. 419– 433. 2010.
- GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The veterinary Journal.** v. 175, n. 1, p. 45–52. 2008.
- HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of American Dermatology.** v. 73, n. 6, p. 911-926. 2015.
- HE, J.; HUANG, F.; LI, J.; CHEN, Q.; CHEN, D.; CHEN, J. Bioinformatics analysis of four proteins of *Leishmania donovani* to guide epitopes vaccine design and drug targets selection. **Acta Tropica.** v. 191, p. 50-59. 2019.
- HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology.** v. 89, n. 1, p. 55-73. 1995.
- HORST, R.T.; TEFERA, T.; ASSEFA, G.; EBRAHIM, A.Z.; DAVIDSON, R.N.; RITMEIJER, K. Field Evaluation of rK39 Test and Direct Agglutination Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in a Population with High Prevalence of Human Immunodeficiency Virus in Ethiopia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 80(6), p. 929 – 934. 2009.
- HOSSAIN, F.; GHOSH, P.; KHAN, A.A.; DUTHIE, M.S.; VALLUR, A.C.; PICONE, A.; HOWARD, R.F.; REED, S.G.; MONDAL, D. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **Plos One.** 2017.
- JACKSON, A.P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Mol Biol Evol.** 27, p. 33-45. 2010.
- KANE, M. M. MOSSER, D M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **J Immunol.** v. 2, n.166, p.1141-1147. 2001.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis : complexity at the host – pathogen interface. **Nature Publishing Group.** v. 9, n. 8, p. 604–615. 2011.
- KUBAR, J.; FRAGAKI, K. Recombinant DNA-derived *Leishmania* proteins: from the laboratory to the field. **Lancet Infect. Dis.** v. 5, n. 2, p. 107–114. 2005.
- LAGE, D.P.; MARTINS, V.T.; DUARTE, M.C.; COSTA, L.E.; GARDE, E.; DIMER, L.M.; KURSANCEW, A.C.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; DE MAGALHÃES-SOARES, D.F.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B.M.; MACHADO-DE-ÁVILA R.A.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.; COELHO, E.A. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasitol Res.** 115(4):1649-58. 2016.

LIMA JÚNIOR, M.S.C.; ZORZENON, D.C.R.; DORVAL, M.E.C.; PONTES, E.R.J.C.; OSHIRO, E.T.; CUNHA, R.; ANDREOTTI, R.; MATOS, M.F.C. Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 3, p. 10 - 15. 2013.

MAIA Z, LÍRIO M, MISTRO S, MENDES CM, MEHTA SR, BADARO R, Comparative study of rk39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**. 6:e1484. 2012.

MANDAL, J.; KHURANA, S.; DUBEY, M. L.; BHATIA, P.; VARMA, N.; MALLA, N. Short Report: Evaluation of Direct Agglutination Test, rk39 Test, and ELISA for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med.** 79(1), p. 76 - 78. 2008.

MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LAGE, D.A.; DUARTE, M.A.; GARDE, E.; COSTA, L.E.; DA SILVA, V.G.; OLIVEIRA, J.S.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; RIBEIRO TEIXEIRA, S.M.R.; FERNANDES, A.P.; SOTO, A.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania infantum* against Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**. 10(9). 2015.

MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUZA, W.J.; DE TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.D.A.S.; SABROZA, P.C.; DE SOUZA, M.A.; RANGEL JUNIOR, F.B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 80, p. 349-57. 1985.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**. v. 10, n. 2, p. 359-375. 1994.

MEDEIROS, I. M.; NASCIMENTO, E.; HINRICHSEN, S. L., Leishmanioses (visceral e tegumentar). Hinrichsen SL. *DIP-Doenças Infecciosas e Parasitárias*. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**. p. 398-409. 2005.

MENDONÇA, D.V.C.; LAGE, D.P.; CALIXTO, S.L.; OTTONI, F.M.; TAVARES, G.S.V.; LUDOLF, F.; *et al.* Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. **Parasitol Res**.117, p. 391-403. 2018.

MENEZES-SOUZA, D.; MENDES, T.A.; GOMES, S.; BARTHOLOMEU, D.C.; FUJIWARA, R.T. Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin I-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. **PLoS Negl Trop Dis**. 8;9(1):e3426. 2015.

MINNING, T.A.; BUA, J.; GARCIA, G.A.; MCGRAW, R.A.; TARLETON, R.L. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 131, p. 55–64. 2003.

MOLYNEUX, D.H. Neglected tropical diseases: now more than just 'other diseases' - the post-2015 agenda. **The royal society of tropical medicine e hygiene**. v. 6, p. 172-180. 2014.

- MONTEIRO, F.M.; MACHADO, A.S.; ROCHA-SILVA, F.; ASSUNÇÃO, C.B.; GRACIELO-MELO, C.; COSTA, L.E.; PORTELA, A.S.; COELHO, E.A.F.; FIGUEIREDO, S.M.; CALIGIORNE, R.B. Canine visceral leishmaniasis: Detection of *Leishmania spp.* genome in peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR). **Microbial Pathogenesis**. v.126, p. 263-268. 2019.
- MOOSAVIAN, S.A.; FALLAH, M.; JAAFARI, M.R. The activity of encapsulated meglumine antimoniate in stearylamine-bearing liposomes against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Experimental parasitology**. 2019.
- MOURA, A.S.; LOPES, H.M.R.O.; MOURÃO, M.V.P.; MORAIS, M.H.F. Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 46(5), p. 589 - 593. 2013.
- NIETO, A; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J. A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**. v. 42, n. 1, p. 39. 2011.
- NOGUEIRA, C.T.; CISTIA, M.L.D.; URBACZEK, A.C.; JUSI, M.G.; VELÁSQUEZ, A.M.A.; MACHADO, R.Z.; FERREIRA, H.; SILVA, F.H.; LANGONI, H.; COSTA, P.I.; GRAMINHA, A.S. Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.v. 113(3), p. 197 - 201. 2018.
- NUNES, C.M.; LIMA, V.M.F.; MELO, G.D.; PAULA, H.B.; PEREIRA, M.E.G.; TRONCO, C.M.T.; HIRAMOTO, R.M.; LAURENTI, M.D.; BURATTINI, M.N. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniasis diagnosis in a longitudinal study. **Braz. J. Vet. Parasitol**. v. 24, n. 4, p. 402-409. 2015.
- NUNES, J.B.; COURA-VITAL, W.; COLOMBO, F.A.; BAETA, F.J.M.; PINHEIRO, A.C.; ROATT, B.M.; REIS, L.E.S.; REIS, A.B.; MARQUES, M.J. Comparative analysis of real-time PCR assays in the detection of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. 2018.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**. v. 69, p. 10-18. 2014.
- PAIVA, R.M.C; GRAZIELLE-SILVA, V.; CARDOSO, M.S.; NAKAGAKI, B.N.; MENDONÇA-NETO, R.P.; CANAVACI, A.M.C.; MELO, N.S.; MARTINELL, P.M.; FERNANDES, A.P.; DAROCHA, W.D.; TEIXEIRA, S.M.R. Amastin Knockdown in *Leishmania braziliensis* Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. **PLOS Pathogens**. 2015.
- PAIVA-CAVALCANT, I M.; MORAIS, R.C.S.; PESSOA-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L.A.M.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S.C.; TAVARES, D.H.C.; BRELAZ-DE-CASTRO, M.C.; SILVA, R.F.; PEREIRA, V.R. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell Biosci** v. 5, n.31, p. 1-10. 2015.
- PALATINIK DE SOUZA, C.B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in immunology**. v. 3, n. 69, p. 1-15. 2012.
- PANIZ-MONDOLFI, A.E.; TALHARI, C.; BUSTOS, M.F.G.; ROSALES, T.; VILLAMIL-GOMES, W.; MARQUEZ, M.; ALVAREZ, A.M.P.; SANCHES, A.I.T.; RODRIGUES-

MORALES, A. American cutaneous leishmaniasis in infancy and childhood. **International Journal of Dermatology**. v. 56, p. 1328-1341. 2017.

PESSOA SB, MARTINS AV. **Parasitologia médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 872, 1988.

PESSOA-E-SILVA, R.; SOUZA, V.V.A.; ANDRADE, T.A.S.; SILVA, A.C.O.; OLIVEIRA, G.A.; TRAJANO-SILVA, L.A.M.; NAKASONE, E.K.N.; PAIVA-CAVALCANTI, M. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: confronting old problems. **Experimental Parasitology**. 2019.

PINTO, A.J.W.; RIBEIRO, V.M.; TAFURI, W.L. The Immunochromatography Use in Canine Visceral Leishmaniasis in Brazil: A “Quick Solution” of a Complex Diagnostic? Rapid Test in Dogs with Leishmaniasis. **Ann Clin Cytol Pathol** 2(4): 1033. 2016.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M.V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; DOS SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, J. JR. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine immunology**. v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission , reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**. v.14, n. 136, p. 1915–1934. 2009.

REGINA-SILVA, S.; FORTES-DIAS, C.L.; MICHALSKY, E.M.; FRANÇA-SILVA, J.C; QUARESMA, P.F.; LIMA, A.C.V.M.R.; TEIXEIRA-NETO, R.G.; DIAS, É.S. Evaluation of parasitological examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive dogs from the screening-culling program in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 47, n. 4, p. 462-468. 2014.

REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**. v. 7, n. 9, p. 581-96. 2007.

RESENDE, L.A.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; GAMA-KER, H.; ROATT, B.M.; DE MENDONÇA, L.Z.; ALVES, L.M.R.; SILVEIRA-LEMONS, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; ARAUJO, M.S.S.; FUJIWARA, R.T.; GONTIJO, N.F.; REIS, A.B.; GIUNCHETTI, R.C. Impact of LbSapSal Vaccine in Canine Immunological and Parasitological Features before and after *Leishmania chagasi*-Challenge. **PLoS One**. 11(8): e0161169. 2016.

RIBEIRO-GOMES, F.L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Cellular and Infection Microbiology**. v.2, p. 1-8. 2012.

ROCHA, M.A.N.; MATOS-ROCHA, T.J.; RIBEIRO, C.M.B.; ABREU, S.R.O. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 78, n.4, p. 609-614. 2018.

ROCHETTE, A.; RAYMOND, F.; CORBEIL, J.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOLOU, B. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular

amastigote forms of *Leishmania infantum*. **Molecular & Biochemical Parasitology**. 165, p. 32–47. 2009.

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.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 55, p. 453-483. 2001.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunol.** v. 3, n. 11, p. 1041-1047. 2002.

Salles, B.C.S.; Dias, D.S.; Steiner, B.T.; Lage, D.P.; Ramos, F.F.; Ribeiro, P.A.F.; Santos, T.T.O.; Lima, M.P.; Costa, L.E.; Chaves, A.T.; Chávez-Fumagalli, M.A.; Fujiwara, R.T.; Buena, L.L.; Caligorne, R.B.; de Magalhães-Soares, D.F.; Silveira, J.A.G.; Machado-de-Ávila, R.A.; Gonçalves, D.U.; Coelho, E.A.F. Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Immunobiology**. 224(1):163-171. 2019.

SALOTRA, P.; DUNCAN, R.C.; SINGH, R.; SUBBA RAJU, B.V.; SREENIVAS, G.; NAKHASI, H.L. Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-zar dermal leishmaniasis. **Microbes and Infection**. v. 8, p. 637-644. 2006.

SANTOS, R.C.; PINHO, F.A.; PASSOS, G.P.; LARANJEIRA, D.F.; BARROUIN-MELO, S.M. Isolation of naturally infecting *Leishmania infantum* from canine samples in Novy-MacNeal-Nicolle medium prepared with defibrinated blood from different animal species. **Veterinary Parasitology**. v. 257, p. 10-14. 2018.

SANTOS, A.R.R.; SERUFO, A.V.; FIGUEIREDO, M.M.; GODOI, L.C.; VITORIO, J.G.; MARCELINO, A.P.; AVELAR, D.M.; RODRIGUES, F.T.G.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MEDEIROS, F.A.C.; JERONIMO, S.M.B.; OLIVEIRA, E.J.; NASCIMENTO, F.C.; TEIXEIRA, S.M.R.; GAZINELLI, R.T.; NAGEM, R.A.P.; FERNANDES, A.P. Evaluation of three recombinant proteins for the development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 114: e180405, p.1-11. 2019.

SCORZA, B.M.; CARVALHO, E.M., WILSON, M.E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **Int. J. Molecular Sciences**. 18, 1296, p.1-26. 2017.

SHARIFI I., AFLATOONIAN MR., DAEI PARIZI MH., HOSSEININASAB A., MOSTAFAVI M., BAMOROVAT M., AGHAEI AFSHAR A., MOHEBALI M., KESHAVARZ H., DANESHVAR H., BABAEI Z., MAHMOUDVAND H., MOHAMMADI MA., SHARIFI F., BARATI M., KAMIABI H., KHALEGHI T., Visceral Leishmaniasis in Southeastern Iran: A Narrative Review. **Iran J Parasitol**. v. 12, n.1, p.1-11. 2017.

SEVÁ, A.P.; OVALLOS, F.G.; AMAKU, M.; CARILLO, E.; MORENO, J.; GALATI, E.A.B.; LOPES, E.G.; SOARES, R.M.; FERREIRA, F. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS One**. v. 11, n.7, p. e0160058. 2016.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**.;30:3834-42. 2012.

SINGH, O.P.; SUNDAR, S. Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era. **Journal of Parasitology Research**. v. 2015, p. 1-10. 2015.

SLATHIA, P.S.; SHARMA, P. Conserved epitopes in variants of amastin protein of *Trypanosoma cruzi* for vaccine design: A bioinformatics approach. **Microbial Pathogenesis**. 125, p. 423–430. 2018.

SOUZA, A.P.; SOTO, M.; COSTA, J.M.L.; BOAVENTURA, V.S.; DE OLIVEIRA, C.I.; CRISTAL, J.R.; BARRALNETTO, M.; BARRAL, A. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLoS One** 8:e66110. 2013.

SOUZA-FILHO, J.A.; BARBOSA, J.R.; FIGUEIREDO, F.B.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; DA SILVA, S.R.; COELHO, G.L.L.M.; MARCELINO, A.P. Performance of Alere™ immunochromatographic test for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology** v. 225, p. 114–116. 2016.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 105, n. 1, p. 1-6. 2011.

STEBUT, E.V. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges**. p. 191-201. 2014.

STOBER, C.B.; LANGE, U.G.; ROBERTS, M.T.; GILMARTIN, B.; FRANCIS, R.; ALMEIDA, R.; *et al.* From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. **Vaccine**. 24:2602-16. 2006.

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

SUNDAR, S.; SINGH, R.K.; BIMAL, S.K.; GIDWANI, K.; MISHRA, A.; MAURYA, R.; SINGH, S.K.; MANANDHAR, K.D.; BOELAERT, M.; RAI, M. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. **Tropical Medicine and International Health**. v. 12, n. 2, p. 284 – 289. 2007.

TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Rev Mol Diagn**. v. 3, n. 5, p. 657-67. 2003.

TESH, R. B., Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 52, n. 3, p. 287-292. 1995.

TEIXEIRA, S.M.R.; RUSSEL, D.G.; KIRCHCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. A Differentially Expressed Gene Family Encoding "Amastin," a Surface Protein of *Dypanosoma cruzi* Amastigotes. **The Journal Of Biological Chemi**. v. 269, p. 20509-20516. 1994.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. CME Article, **Jornal of the German Society of Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 191-200. 2015.

WEIGLE K.A.; VALDERRAMA L.; ARIAS A.L.; SANTRICH C.; SARAVIA N.G. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. **Am J Trop Med Hyg.** v. 44, n. 3, p. 260-71. 1991.

WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. Rev **Saude Publica.** v. 48, n.5, p. 851-6. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser: 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Fact sheet. n. 375. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. Ser: 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las americas. Ser: 2019.

ZHANG, W.W.; CHAREST, H.; GHEDIN, E.; MATLASHEWSKI, G. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol.** 78, p. 79-90. 1996.

8. ANEXOS

Comprovante Comissão de Ética no Uso de Animais

| | |
|---|---|
|  <p>UFMG</p> | <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p> |
| <p>Prezado(a):</p> | |
| <p>Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.</p> | |
| <p>Protocolo CEUA: 244/2018 Título do projeto: Aprimoramento do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil por meio do desenvolvimento de nova plataforma de diagnóstico rápido empregando antígenos recombinantes de Leishmania incorporados a sistemas point-of-care desenvolvidos por tecnologia de microfluidos Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Eduardo Antonio Ferraz Coelho Unidade: Colegio Técnico Departamento: Colegio Técnico</p> | |
| <p>Situação atual: Decisão Final - Aprovado</p> | |
| <p>Aprovado na reunião do dia 03/09/2018. Validade: 03/09/2018 à 02/09/2023 Belo Horizonte, 04/09/2018.</p> | |
| <p>Atenciosamente,</p> | |
| <p>Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</p> | <p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpg.ufmg.br</p> |



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls

Danniele L. Vale ^a, Daniel S. Dias ^a, Amanda S. Machado ^b, Patrícia A.F. Ribeiro ^a, Daniela P. Lage ^a, Lourena E. Costa ^a, Bethina T. Steiner ^c, Grasielle S.V. Tavares ^a, Fernanda F. Ramos ^a, Abel Martínez-Rodrigo ^d, Miguel A. Chávez-Fumagalli ^a, Rachel B. Caligiorne ^b, Danielle F. de Magalhães-Soares ^e, Julia A.G. Silveira ^f, Ricardo A. Machado-de-Ávila ^c, Antônio L. Teixeira ^{a,g}, Eduardo A.F. Coelho ^{a,h,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil

^b Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte. Rua Domingos Vieira, 590, Santa Efigênia, 30150-240, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil

^d Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Science, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^f Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^g Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX, USA; 1941 East Road, Houston, TX, 77041

^h Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 December 2018

Received in revised form 9 April 2019

Accepted 29 April 2019

Available online xxx

Keywords:

Amastin
Recombinant proteins
Synthetic peptides
Diagnosis
Response immune
Visceral leishmaniasis

ABSTRACT

The diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) presents problems due to the toxicity and/or high cost of drugs. In addition, no vaccine exists to protect against human disease. In this study, the antigenicity and immunogenicity of amastin protein were evaluated in *L. infantum*-infected dogs and humans. For the diagnosis, besides the recombinant protein, 1 linear B-cell epitope was synthesized and evaluated in serological assays. Results showed high sensitivity and specificity values to detect the disease when both antigens were employed against a canine and human serological panel. By contrast, when using rA2 and a soluble *Leishmania* antigenic preparation, sensitivity and specificity values proved to be lower. A preliminary immunogenicity study showed that the amastin protein induced high IFN- γ and low IL-10 production in stimulated PBMC derived from treated VL patients and healthy subjects, thus suggesting a potential use of this protein as an immunogen to protect against human disease.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmania protozoa are the causative agents of leishmaniasis in 98 countries worldwide, threatening over 380 million people, more than 12 million of whom are infected by these parasites (WHO, 2016). Visceral leishmaniasis (VL) is a severe clinical manifestation of disease, which accounts for approximately 0.5 million cases annually (Burza et al. 2018). In the Americas, the etiological agent is the *Leishmania*

infantum species, which is transmitted through the bite of the phlebotomine vector, with dogs representing the main urban reservoirs of the parasites (Savoia 2015). *Leishmania* parasites are found in the form of metacyclic promastigotes that are flagellated and able to transmit the disease to mammalian hosts, whereas the amastigote forms are intracellular and nonflagellated forms found in phagolysosomes from infected mammalian cells, such as neutrophils, macrophages, and dendritic cells, among others (Subramanian and Sarkar 2018).

Clinical manifestations from canine VL (CVL) are variable, ranging from a subclinical or asymptomatic infection to the severe and symptomatic disease (Ferreira et al. 2007). Cutaneous and organic alterations, such as lymph node enlargement, skin lesions, loss of weight, lethargy, splenomegaly, fever, ocular alterations, epistaxis, and lameness, have all been found in symptomatic VL (Solano-Gallego et al. 2011). In

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel./fax: +55 31 3409 4983.

E-mail address: eduardofemazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.015>
0732-8893/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: D.L. Vale, D.S. Dias, A.S. Machado, et al., Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral leishmaniasis..., Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.015>