

**Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG**  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**Desenvolvimento de métodos moleculares e sorológicos  
para diagnóstico específico de infecções por  
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Jordanna Luíza de Lima Celeste

Belo Horizonte

2019

**Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG**  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB  
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**Desenvolvimento de métodos moleculares e sorológicos  
para diagnóstico específico de infecções por *Leishmania*  
(*Leishmania*) *amazonensis***

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

**Orientadora:** Dra. Héli da Monteiro de Andrade

**Co-orientadora:** Dra. Simone da Fonseca Pires

**Colaboradora:** Dra. Roberta Lima Caldeira

Belo Horizonte

2019

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

*Carl Jung*

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo!

Aos meus pais, Márcio e Cida que nunca mediram esforços para me ajudar a chegar até aqui.

À minha irmã Dhara e à minha avó Graça por todo o apoio.

Ao meu marido Fernando, por todo o incentivo, companheirismo e aquela palavra de conforto nos momentos mais difíceis. Foi ele que sempre esteve comigo durante toda essa caminhada.

À minha orientadora Héliida Andrade, por todo o ensinamento, dedicação e paciência. Sempre disposta a ajudar e compartilhar seus conhecimentos, com palavras de apoio e incentivo em todos os momentos. Só tenho a agradecer por tudo que tem feito por mim durante todos esses anos. Gratidão eterna!

À minha co-orientadora Simone Pires, por toda a ajuda e os bons momentos de convivência.

À Roberta Caldeira, colaboradora desse projeto, por compartilhar sua experiência e pela grande ajuda com a técnica de LAMP.

Aos colegas do laboratório: Andreza, Angélica, Bárbara, Bruna, Elaine, Flávia, Helóine, Ivana, Júnior, João Carlos, Ramon, Thaísa e Valéria. Alguns infelizmente não fazem mais parte da família LabLeish, mas agradeço pela amizade e a convivência sempre tão agradável.

À Adriana Raabe, pela amizade, análises no MALDI e ajuda na identificação das proteínas.

Aos meus amigos que mesmo longe estão sempre presentes em minha vida: Ana Paula, Andressa, Ramon e Thallyta, que acompanharam parte da minha caminhada de perto.

Ao Dr. Ricardo Victor por gentilmente ceder a amostra de DNA de *Toxoplasma gondii*.

À Dra. Júlia Silveira por gentilmente ceder a amostra de DNA de *Babesia canis*.

Ao Dr. Rodrigo Soares por gentilmente ceder amostras de DNA de diferentes isolados de *Leishmania amazonensis*.

À Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) pelas amostras de cultura disponibilizadas.

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem o meu trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da UFMG.

Aos funcionários, professores e colegas do Departamento de Parasitologia da UFMG, em especial às secretárias Sumara e Sibebe.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG.

## Resumo

A ampla distribuição e sobreposição de espécies de *Leishmania* e de diferentes formas clínicas das leishmanioses no país podem afetar diretamente o curso clínico da doença, diagnóstico, controle e tratamento. Com isso, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico espécie-específicos e que possam ser utilizados na rotina são necessários e de grande importância. No Brasil, a espécie *Leishmania amazonensis* é agente etiológico principalmente da forma cutânea da doença, mas já foi também encontrada promovendo doença visceral em humanos e cães. Além disso, sua coexistência com outras espécies do parasito, como *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral, torna de suma importância a identificação da espécie durante o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. Para isso, no presente trabalho, como teste molecular, padronizamos a técnica de LAMP (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop), a partir do desenho e utilização de iniciadores específicos para *L. amazonensis* com visualização do resultado utilizando gel de poliacrilamida e detecção colorimétrica (SYBR® Safe). A reação apresentou 100% de especificidade quando comparado as espécies *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. guyanensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Babesia canis* e *Toxoplasma gondii* e quando testado diferentes cepas de *L. amazonensis*. O limite de detecção da reação foi de 10pg de DNA de *L. amazonensis*. Apresentou 89% de sensibilidade quando comparada a PCR convencional utilizando amostras de DNA de pele de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis* (n=9), *L. infantum* (n=9) e coinfeção (n=9). Para o desenvolvimento de um teste sorológico, foi realizada uma abordagem imunoproteômica para seleção de proteínas antigênicas espécie-específicas, para isso, utilizamos extrato proteico de *L. amazonensis* fracionados em eletroforese bi-dimensional (2-DE) associados a western blot (WB) com pool de soros de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis* e *L. infantum*. A sobreposição entre as imagens de gel 2-DE e membranas de WB permitiu a seleção de 8 spots reativos somente a soros de animais infectados com *L. amazonensis* e não reativos a soros de infectados com *L. infantum* ou de não infectados. Foram identificadas duas proteínas em 6/8 spots. Uma delas, a HSP70, produzida de forma recombinante foi utilizada como antígeno em um teste de ELISA com pool de soros de hamsters infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum*, coinfectados e não infectados. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) apenas quando comparados os grupos infectados ao controle não infectado, não tendo sido ainda um antígeno espécie-específico.

Palavras-chave: diagnóstico específico, imunoproteômica, LAMP, *Leishmania amazonensis*.

## Abstract

The wide distribution and overlapping of *Leishmania* species and different clinical forms of leishmaniasis in the country can directly affect the clinical course of the disease, diagnosis, control and treatment. Thereby, the development of species-specific diagnostic methods that can be used routinely are necessary and of great importance. In Brazil, *Leishmania amazonensis* is an etiological agent mainly of the cutaneous form of the disease, but has already been found promoting visceral disease in humans and dogs. In addition, its coexistence with other species of the parasite, such as *L. infantum*, etiological agent of visceral leishmaniasis, makes it very important to identify the species during the diagnosis of *Leishmania* spp. For this, in the present work, as molecular test, we standardized the LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) technique, with the design and use of specific primers for *L. amazonensis* and visualization of the result using polyacrylamide gel and colorimetric detection (SYBR® Safe). The reaction showed 100% specificity when compared *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. guyanensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Babesia canis* and *Toxoplasma gondii* species and when tested different strains of *L. amazonensis*. The detection limit of the reaction was 10pg of *L. amazonensis* DNA. It presented 89% sensitivity when compared to conventional PCR using hamster skin DNA samples experimentally infected with *L. amazonensis* (n=9), *L. infantum* (n=9) and coinfection (n=9). For the development of a serological test, an immunoproteomic approach was used to select species-specific antigenic proteins. For this, we used protein extract of *L. amazonensis* fractionated in bi-dimensional electrophoresis (2-DE) and western blot (WB) with pool of hamster sera experimentally infected with *L. amazonensis* and *L. infantum*. The overlap between 2-DE gel images and WB membranes allowed the selection of 8 spots reactive only to sera from animals infected with *L. amazonensis* and not reactive to sera from *L. infantum* or uninfected. Two proteins were identified in 6/8 spots. One of them, the recombinantly produced HSP-70 was used as an antigen in an ELISA test with pool of hamsters sera infected with *L. amazonensis*, *L. infantum*, coinfecting and uninfected. There was a significant difference ( $P < 0.05$ ) only when the infected groups were compared to the uninfected control, not being a species-specific antigen.

Keywords: immunoproteomic, LAMP, *Leishmania amazonensis*, specific diagnosis.

## Lista de figuras

**Figura 1:** Localização dos quatro iniciadores (FIP, F3, BIP e B3) e as seis regiões da sequência alvo correspondente (F1c, F2c, F3c, B1c, B2c e B3c). O FIP na região F2 (na extremidade 3') que é complementar à região F2c e na mesma sequência que a região F1c na extremidade 5'; F3 na região F3 que é complementar à região F3c; BIP na região B2 (na extremidade 3') que é complementar à região B2c e na mesma sequência da região B1c na extremidade 5' e B3 na região B3 que é complementar à região B3c (Eiken Chemical Co., Ltd.).

**Figura 2:** Na etapa não cíclica, inicialmente ocorre a separação da dupla fita de DNA pela ação da enzima Bst DNA polimerase e ligação do FIP (1); síntese da fita a partir de FIP (2); ligação do F3 (3); síntese da fita a partir de F3 e deslocamento da fita formada anteriormente por FIP (4); a fita deslocada sintetizada a partir de FIP (5); ocorre ligação de BIP, a fita é sintetizada e, em seguida, liga-se B3 (6); formação da nova fita a partir de B3 e a estrutura de *loop* é linearizada (7); separação da fita em que as extremidades são FIP e BIP que formam os *loops* para, posteriormente, iniciar a etapa cíclica (Eiken Chemical Co., Ltd.).

**Figura 3:** A etapa cíclica se inicia a partir da estrutura em formato de haltere (8); ocorre a síntese a partir de um dos *loops* e ligação do FIP que inicia a síntese de uma nova fita e deslocamento da fita anterior (9); formação da estrutura que inicia o ciclo de alongação que ocorrerá ligação dos iniciadores de maneira alternada originando estruturas de tamanhos variados, todos contendo a sequência alvo (10) e formação de estruturas em formato de haltere que irão iniciar novamente as etapas (8) e (9) do ciclo de amplificação (11) (Eiken Chemical Co., Ltd.).

**Figura 4:** Amplificação utilizando os *Loop primers* (LpB e LpF). As posições destes iniciadores são entre as regiões de B1 e B2 ou F1 e F2 da estrutura semelhante a um haltere, fornecendo um número aumentado de pontos de partida para a síntese de DNA, em que observa-se um produto amplificado contendo seis *loops*. No método LAMP original, quatro desses *loops* não seriam usados, mas através do uso de *Loop primers*, todos os *loops* de fita simples podem ser usados como pontos de partida para a síntese de DNA (Eiken Chemical Co., Ltd.).



**Figura 5:** Localização dos seis iniciadores na sequência do minicírculo do kDNA de *L. amazonensis* selecionados para a padronização da reação de LAMP. A sequência de cada iniciador está identificada por uma cor.

**Figura 6:** Géis de poliacrilamida 6% corados por prata (A) e detecção colorimétrica utilizando SYBR® Safe (B) com o teste de especificidade da reação de LAMP com amostras de diferentes espécies de protozoários. 1 e 10 = padrão de peso molecular de 50 pares de bases; 2 = *L. amazonensis*; 3 = *L. infantum* (cepa BH401); 4 = *L. braziliensis*; 5 = *L. infantum* (cepa LPC-RPV); 6 = *L. major*; 7 = *L. mexicana*; 8 = *L. donovani*; 9 = *L. guyanensis*; 11 = *B. canis*; 12 = *T. cruzi*; 13 = *T. gondii*; 14 = controle negativo (DNA de hamster não infectado); 15 = controle mix (sem DNA).

**Figura 7:** Gel de poliacrilamida 6% corado por prata (A) e detecção colorimétrica utilizando SYBR® Safe (B) com a reação de LAMP utilizando diferentes cepas de *L. amazonensis*. 1= padrão de peso molecular de 1kb; 2= IFLA/BR/1967/PH8; 3= MHOM/BR/1989/BA276; 4= MHOM/BR/75/Josefa; 5= MCAN/BR/2012/GV01; 6= MCAN/BR/2012/GV02; 7= controle negativo (DNA de hamster não infectado); 8= controle mix (sem DNA).

**Figura 8:** Gel de poliacrilamida 6% corado por prata e detecção colorimétrica utilizando SYBR® Safe (B) com o teste de sensibilidade da reação de LAMP com diferentes diluições do DNA de *L. amazonensis* em mistura com DNA de hamster não infectado. Diluições de 10ng até 100fg. 1=padrão de peso molecular de 50 pares de bases; 2= controle *L. amazonensis*; 3= 10ng; 4= 1ng; 5= 100pg; 6= 10pg; 7= 1pg; 8= 100fg; 9= controle negativo (DNA de hamster não infectado); 10= controle mix (sem DNA).

**Figura 9:** Géis de poliacrilamida 6% representativos (A) e detecção colorimétrica utilizando SYBR® Safe (B) com amostras de pele de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum* e coinfeção. 1= padrão de peso molecular de 50 pares de bases; 2= controle *L. amazonensis*; 3= controle *L. infantum*; 4 a 6 = pele *L. amazonensis*; 7 = pele coinfeção; 8 = pele *L. infantum*; 9 = controle negativo (DNA de hamster não infectado).

**Figura 10:** Gráfico com a carga parasitária (log10) na qPCR das nove amostras de DNA de pele de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis* (amostras nº1 a nº 9).

**Figura 11:** Padronização do WB. Extrato proteico de *L. amazonensis* (40µg/canaleta) fracionados em SDS-PAGE 12% e transferido para membrana de nitrocelulose, incubada com diferentes diluições de *pool* de soros (1:50, 1:100 e 1:200) de hamsters infectados com *L. amazonensis* como anticorpo primário e de conjugado anti-IgG de hamster (1:1000, 1:2000 e 1:2500) como anticorpo secundário. Revelação com DAB,  $\alpha$ -4-cloronaftol e peróxido de hidrogênio.

**Figura 12:** Padronização do WB. Extrato proteico de *L. amazonensis* (40µg/canaleta) fracionados em SDS-PAGE 12% e transferido para membrana de nitrocelulose, incubada com diferentes diluições de *pool* de soros (1:50, 1:100 e 1:200) de hamsters infectados com *L. infantum* como anticorpo primário e de conjugado anti-IgG de hamster (1:1000, 1:2000 e 1:2500) como anticorpo secundário. Revelação com DAB,  $\alpha$ -4-cloronaftol e peróxido de hidrogênio.

**Figura 13:** SDS-PAGE 12%, 2-DE com *strips* de 18 cm, pH 4-7, com 800µg de extrato proteico de *L. amazonensis*, corado por comassie G-250. Os *spots* de interesse estão circulados e numerados de 1 a 8 (A). Na figura B, C e D, estão as membranas do WB com extrato proteico de *L. amazonensis* incubadas com soro de hamsters infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum* e não infectado, respectivamente. Na membrana B com o soro homólogo (infecção por *L. amazonensis*), observa-se os mesmos *spots* selecionados no gel.

**Figura 14:** Gráfico com a absorbância no ELISA realizado utilizando *pool* de soros de hamsters (n=9 em cada grupo) experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum*, coinfectados e não infectados. A diferença estatística significativa está representada por \*(P<0,05) e # quando não houve diferença significativa.

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Composição dos grupos experimentais de acordo com via e local da inoculação e espécie utilizada.

**Tabela 2:** Relação das amostras de cultura e DNA utilizadas para a padronização da técnica de LAMP, indicando a espécie do parasito, procedência e tipo de amostra.

**Tabela 3:** Alvo e sequência dos iniciadores utilizados para padronização da técnica de LAMP específica para *L. amazonensis*.

**Tabela 4:** Relação das amostras positivas na PCR e LAMP e identificação da espécie por PCR-RFLP nas amostras de pele de hamsters das diferentes infecções experimentais.

**Tabela 5:** Resultados da LAMP e qPCR das amostras de DNA de pele de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis*.

**Tabela 6:** Lista de proteínas antigênicas identificadas em cada um dos *spots* selecionados, número de acesso no UniProtKB, massa molecular (MM) teórica e experimental e as sequências dos peptídeos.

## Lista de abreviaturas e siglas

2-DE	Eletroforese bi-dimensional
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
IAA	Iodoacetamida
IEF	<i>Isoelectric focusing</i>
IgG	Imunoglobulina da classe G
ITS1	<i>Internal transcribed spacer-1</i>
kD	Kilodaltons
kDNA	DNA do cinetoplasto
LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i>
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
RIFI	Imunofluorescência indireta
RNAr	RNA ribossomal
RPMI:	Meio Roswell Park Memorial Institute
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
OPD	<i>Ortho-phenylenediamine</i>
WB	<i>Western blot</i>

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>14</b>
1.1	<i>Leishmania</i> e as leishmanioses	14
1.2	Epidemiologia das leishmanioses	17
1.3	A visceralização de <i>L. amazonensis</i> e coinfeção em leishmaniose	18
1.4	Diagnóstico das leishmanioses e a LAMP	21
1.5	Imunoproteômica	29
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>31</b>
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos</b>	<b>32</b>
3.1	Amostras biológicas	32
3.2	Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i> (LAMP)	35
3.3	PCR em tempo real (qPCR)	36
3.4	Imunoproteômica	36
3.4.1	Extrato proteico	36
3.4.2	Eletroforese bi-dimensional (2-DE)	37
3.4.3	Western blot	37
3.4.4	Seleção e identificação das proteínas antigênicas	38
4.5	Produção da proteína recombinante	39
4.6	ELISA	40
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>41</b>
4.1	Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i> (LAMP)	41
4.2	PCR em tempo real (qPCR)	48
4.3	Imunoproteômica	50
4.3.1	Padronização do Western blot (WB)	50
4.3.2	Seleção e identificação das proteínas antigênicas	50
4.4	ELISA	55
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Anexo</b>	<b>76</b>

# 1 Introdução

## 1.1 *Leishmania* e as leishmanioses

As leishmanioses são parasitoses que englobam diversas manifestações clínicas e tem como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania* (Ross 1903), pertencentes à ordem Kinetoplastida. O gênero *Leishmania* compreende cerca de 35 espécies, destas, aproximadamente 20 são patogênicas para os seres humanos (Ashford 2000). As espécies clinicamente relevantes foram classificadas em dois subgêneros de acordo com seu desenvolvimento no trato alimentar do inseto vetor, assim, as espécies do subgênero *Viannia* apresentam desenvolvimento no intestino posterior, migrando para o intestino médio, enquanto as espécies do subgênero *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio e anterior (Lainson et al. 1987).

*Leishmania* são organismos digenéticos que vivem uma fase do seu ciclo de vida em insetos vetores fêmeas pertencentes à Ordem Diptera que podem ser dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo), e a outra fase em hospedeiros mamíferos pertencentes a diversas ordens como Carnívora (cães e gatos), Edentata (tatus e preguiças), Marsupialia (gambás), Perissodactyla (cavalos), Primatas (humanos e macacos) e Rodentia (ratos) (Ashford 2000; Desjeux 2004; Gramiccia & Gradoni 2005). Devido aos diferentes ambientes nos hospedeiros invertebrados e mamíferos, os parasitos apresentam dois estágios de desenvolvimento: a forma promastigota extracelular, móvel e flagelada que se desenvolve dentro do trato digestivo do inseto e a forma amastigota intracelular, não-móvel que infecta macrófagos dos hospedeiros vertebrados (Bañuls et al. 2007).

Formas promastigotas são encontradas livres ou aderidas ao trato digestivo do inseto, no qual passam por processos de diferenciação e divisão até chegarem à forma promastigota metacíclica, estas não se dividem e são infectantes para o hospedeiro mamífero. No hospedeiro invertebrado, foi demonstrado que uma segunda ingestão de sangue não infectado por flebotomíneos infectados por *Leishmania* desencadeia a desdiferenciação de promastigotas metacíclicas, considerado um estágio terminalmente diferenciado dentro do vetor, a um estágio semelhante à leptomonadas, a promastigota retroleptomonada. A metaciclogênese reversa ocorre após cada repasto sanguíneo subsequente, onde promastigotas de retroleptomonadas se multiplicam rapidamente e se diferenciam para promastigotas metacíclicas, aumentando a infecciosidade do flebotomíneo. Esses achados colocam fontes de sangue prontamente

disponíveis como um elemento crítico na transmissão e propagação de patógenos transmitidos por vetores (Serafim et al. 2018).

A transmissão aos vertebrados ocorre quando a fêmea do inseto realiza o repasto sanguíneo, regurgitando os parasitos juntamente com a saliva. As promastigotas podem ser fagocitadas após a infecção de neutrófilos que são rapidamente recrutados para o sítio de inoculação ou diretamente pelos macrófagos, e internalizadas dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), envolvido na destruição de microorganismos (Peters et al. 2008). Os parasitos apresentam mecanismos que os permitem evadir-se, dentre outros, da ação microbicida do macrófago e após se estabelecerem no meio intracelular se transformam em amastigotas. Estas se dividem dentro da célula hospedeira até rompê-la, permitindo a infecção dos fagócitos que estiverem no local, permanecendo ali e se proliferando mesmo sob a ação de enzimas lisossomais, propagando a infecção. Durante este processo ocorre a liberação de produtos antigênicos que serão apresentados ao sistema imune, gerando uma resposta imune específica. Os mecanismos de eliminação das amastigotas pelos macrófagos ativados pelo IFN- $\gamma$ , envolvem a síntese de radicais de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico. As células do sistema mononuclear fagocitário infectadas são capturadas pelo vetor juntamente com o sangue no momento do repasto sanguíneo e, em seguida, as amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do inseto, dando continuidade ao ciclo de vida do parasito. Amastigotas e promastigotas se dividem repetidamente por divisão binária longitudinal (Lainson & Shaw 1978; Ashford 2000; Choi & Lerner 2001).

Um dos principais fatores que determinam o tipo de patologia é a espécie e virulência do parasito, além da resposta imune e susceptibilidade genética do hospedeiro. O primeiro sinal de infecção tipicamente é um pequeno eritema no local onde o vetor infectado realizou o repasto sanguíneo e regurgitou os parasitos na pele. Uma vez que a infecção se estabelece, inicia uma reação inflamatória, que na derme causa a forma cutânea da doença, podendo ser localizada ou difusa; na mucosa causa a forma mucocutânea; e a propagação metastática da infecção para órgãos como o baço, fígado, linfonodos e medula óssea caracteriza a forma visceral. *Leishmania* tende a se localizar em tecidos onde células como macrófagos existam em grande número (Berman 2005; Reithinger & Dujardin 2007; Kobets et al. 2012).

Dessa forma, as leishmanioses são classificadas nas seguintes formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea disseminada (LCDB), leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL) (Silveira et al. 2004; Babiker et al. 2014). A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença responsável por consideráveis morbidades de um

grande número de pessoas em focos endêmicos, embora não seja fatal e em alguns casos o processo de cura ocorra sem tratamento com o desenvolvimento de imunidade celular e humoral do hospedeiro (Rangel & Lainson 2009). A LCL, que é a mais comum da LT, inicia-se no local de entrada do parasito e se manifesta primeiro como pápulas que se transformam em úlceras, podendo ser únicas ou múltiplas e normalmente aparecem em áreas expostas, como face, braços e pernas. As lesões típicas são caracterizadas como úlceras circulares ou ovais, com base eritematosa, infiltrada, firme, avermelhada e granulosa e borda elevada bem delimitada (Quaresma et al. 2018). A resposta imune é predominantemente mediada por células T e um infiltrado inflamatório no local da infecção é visível na maioria dos casos, que geralmente são relatados já na fase ulcerativa (Mehregan et al. 1999). O período de incubação pode variar de duas semanas até vários meses. É causada, principalmente por *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. lainsoni* no Novo Mundo, incluindo o Brasil. A presença de lesões incomuns caracterizam a LT atípica. Os pacientes podem apresentar lesões de diferentes formas: verrucosa, crostas, lupóide, tumor, pápulas, placas ulceradas ou outros tipos de lesões. As espécies *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. major* e *L. donovani* já foram encontradas causando a LT atípica (Meireles et al. 2017; Quaresma et al. 2018).

A LCD é rara e produz lesões crônicas nodulares e não ulcerativas disseminadas na pele, acometendo indivíduos com deficiência na resposta celular. No Velho Mundo pode ser causada pela *L. aethiopica* enquanto no Novo Mundo é mais associada a *L. amazonensis*. Na LMC, as lesões podem destruir parcial ou totalmente a mucosa do nariz, da boca e faringe, ocorre no Novo Mundo após uma leishmaniose cutânea não tratada adequadamente, normalmente causada por *L. braziliensis* (Silveira et al. 2004; Berman 2005). Juntamente com os casos de LCL e intermediária entre as formas de patogenicidade extrema (LMC e LCD), alguns pacientes podem apresentar formas disseminadas da infecção (LCDB), em que foi possível determinar a localização das lesões primárias e secundárias na pele. A disseminação do parasito ocorre de forma rápida, e esses casos estão associados às espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Silveira et al. 2004). A leishmaniose dérmica pós calazar é uma forma rara da LT e é observada após uma leishmaniose visceral devido à infecção por *L. donovani* em países como Sudão e Índia (Murray et al. 2005).

No Brasil, a leishmaniose visceral é uma doença de notificação compulsória e que pode ter evolução grave, devendo ser diagnosticada precocemente. É caracterizada em sua forma típica por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, associado a achados



laboratoriais incluindo pancitopenia, leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, com intenso e difundido parasitismo em órgãos como fígado, baço e medula óssea. O período de incubação pode variar de dois a quatro meses. A doença pode ter evolução aguda, subaguda ou crônica. Um espectro de manifestações clínicas ocorre na LV, que vai desde assintomática ou oligossintomática, com a possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes. É causada por *L. donovani* no Velho Mundo, tendo como reservatório os seres humanos e por *L. infantum* no Sudeste da Europa, na região do Mediterrâneo e no Novo Mundo, incluindo o Brasil, tendo os canídeos como reservatórios domésticos (Desjeux 2004; Oliveira et al. 2004).

## **1.2 Epidemiologia das leishmanioses**

As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública, sendo consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em conjunto, como uma das seis mais destacadas doenças tropicais de países em desenvolvimento, e atualmente encontram-se entre as principais endemias no mundo (WHO 2017). Constituem doenças endêmicas em países tropicais, subtropicais e temperados, ocorrendo em 98 países. Atualmente, existem cerca de 12 milhões de casos de leishmanioses em todo o mundo, 350 milhões de pessoas são consideradas com risco de contrair a doença e estima-se que 2 milhões de novos casos ocorram a cada ano, sendo cerca de 1,5 milhões de casos de LT e 500.000 de casos de LV. Mais de 90% dos casos de LV estão concentrados em seis países: Índia, Somália, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A distribuição da LT é mais ampla, ocorrendo nas Américas, Região Mediterrânea, Ásia Ocidental e Central e no Oriente Médio. Dez países apresentam de 70 a 75% dos casos mundiais de LT: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru. Considerando que em poucos países a notificação é compulsória, estima-se que a incidência das leishmanioses seja subestimada (Desjeux 2004; den Boer et al. 2011; Alvar et al. 2012; WHO 2017).

As leishmanioses são também consideradas como re-emergentes e emergentes com expansão geográfica devido à urbanização, migração humana, modificações ambientais conduzidas pelo homem, coinfeção com outras doenças e estado imunológico (Desjeux 2004; Dujardin 2006). Esta expansão levou ao surgimento de novos focos de transmissão e reativação em áreas previamente controladas (Barata et al. 2013). Outros fatores que devem ser considerados são as dificuldades referentes ao diagnóstico, tratamento e controle das diversas

formas das leishmanioses, interferindo diretamente no perfil epidemiológico da doença (Marzochi & Marzochi 1994).

Nas Américas, as leishmanioses seguem sendo um problema de saúde pública devido a sua magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica. Afeta predominantemente os mais pobres, sobretudo em países em desenvolvimento. Com o propósito de consolidar e avançar nas ações para reduzir a morbimortalidade por leishmanioses nas Américas, foi elaborado o Plano de Ação de Leishmanioses nas Américas 2017-2022, com metas regionais específicas, em que se destacam: reduzir a letalidade por leishmaniose visceral em 50% até 2022 e reduzir a proporção de casos de leishmaniose cutânea em crianças menores de 10 anos em 50% até 2022 (SisLeish-OPAS/OMS 2017).

A LT apresenta-se em fase de expansão geográfica no Brasil. Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, começou a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas. No ano de 2015 aconteceram 19.395 novos casos, sendo 94,5% da forma cutânea e 5,5% da mucocutânea. Incidência de 15,3 a cada 100.000 habitantes, considerado muito intenso e cerca de 60% da população se encontra em zonas de transmissão (SisLeish-OPAS/OMS 2017).

No Brasil, a LV é uma doença endêmica, no entanto, têm sido registrados surtos frequentes em diversas regiões endêmicas. Inicialmente, sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas, hoje, encontra-se no grupo de países com transmissão em expansão. Está distribuída em 21 unidades da federação, atingindo as cinco regiões brasileiras. Nas Américas, os casos humanos de LV estão presentes em 12 países, no entanto, 96% dos casos são relatados no Brasil. No ano de 2015 o número de casos foi de 3.289 e a incidência de 2,5 casos por 100.000 habitantes. De um total de 257 casos de coinfeção de LV-HIV nas Américas, 244 foram registrados no Brasil; e de 268 casos de óbitos por LV, 251 foram reportados no Brasil (SisLeish-OPAS/OMS 2017).

### **1.3 A visceralização de *L. amazonensis* e coinfeção em leishmaniose**

A espécie *L. amazonensis* pode causar um amplo espectro de formas clínicas em humanos, desde a forma cutânea e mucocutânea, até a forma visceral (Barral et al. 1986; Barral et al. 1991; Aleixo et al. 2006; de Souza et al. 2018). Alguns trabalhos têm demonstrado o desenvolvimento de LV causada por *L. amazonensis* acometendo cães de área urbana em diferentes estados do Brasil (Tolezano et al. 2007; Dias et al. 2011; Hoffmann et al. 2012; Sanches et al. 2016; Valdivia et al. 2017). A visceralização causada por espécies de *Leishmania*

responsáveis pela LT já foi relatada em infecções utilizando animais experimentais (Almeida et al. 1996; Abreu-Silva et al. 2004; Soliman 2006; Mahmoudzadeh-Niknam et al. 2007; Kobets et al. 2012; Gomes-Silva et al. 2013; Ribeiro-Romão et al. 2014; Celeste et al. 2017) mostrando que algumas espécies podem se disseminar para vários órgãos, causando patologia similar com as produzidas em seres humanos e em cães com a doença visceral. Em trabalho anterior do nosso grupo, mostrou-se que a espécie *L. amazonensis* foi capaz de causar doença cutânea e visceral em hamsters experimentalmente infectados, se disseminando para órgãos como baço e fígado e causando doença grave quando em coinfeção com *L. infantum* (Celeste et al. 2017).

As espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* possuem ampla distribuição geográfica no Brasil com áreas de sobreposição, onde ocorrem casos autóctones tanto de LV causada por *L. infantum* quanto de LT causada por *L. amazonensis*, nas regiões Norte (Pará), Nordeste (Bahia, Maranhão e Ceará), Sudeste (Minas Gerais) e Centro-Oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul). A espécie *L. amazonensis* já foi relatada em infecção natural em flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis*, responsável pela transmissão de *L. infantum*, indicando a possibilidade de transmissão tanto de LV quanto de LC em Mato Grosso do Sul (Savani et al. 2009). Os últimos levantamentos de fauna de flebotomíneos no estado de Minas Gerais indicaram que as espécies mais abundantes na Região Metropolitana de Belo Horizonte foram *Lutzomyia whitmani*, principalmente associada à transmissão de *L. braziliensis* e secundariamente com *L. amazonensis*, e *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor de transmissão de *L. infantum* (Margonari et al. 2010; Saraiva et al. 2015) e nessa mesma região foram encontrados cães infectados pelas três espécies: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (Souza et al. 2019).

Em áreas com sobreposição de transmissão de LV e LT o controle torna-se bem complexo, e, medidas diferenciadas para cada doença devem se basear em métodos de diagnóstico parasitológico em conjunto com a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida. A diversidade epidemiológica das diferentes formas da doença impossibilita o seu controle utilizando uma única metodologia ou ferramenta (Madeira et al. 2006; Silva et al. 2011; Pires et al. 2014). No Brasil, áreas de sobreposição entre diferentes formas clínicas e agentes etiológicos das leishmanioses são frequentes, com a possibilidade de coinfeções, o que poderia influenciar no curso clínico da doença, diagnóstico, controle e tratamento.

Casos de coinfeção com duas espécies de *Leishmania* em diferentes países foram relatados em seres humanos. No Velho Mundo, um paciente diagnosticado com LV apresentou *L. donovani* e *L. major* na cultura de aspirado do baço no Quênia (Mebrahtu et al. 1991); em amostras de aspirado de linfonodos, quatro casos de coinfeção foram relatados em pacientes diagnosticados com LV, um paciente com *L. donovani* e *L. aethiopica*, e três com *L. donovani*

e *L. major* no Sudão (Ibrahim et al. 1994); no Iraque, *L. donovani* e *L. major* encontradas em medula óssea e lesão cutânea respectivamente (al-Diwany et al. 1995); infecção mista com duas cepas de *L. infantum* em amostras de medula óssea, que foi responsável por falha terapêutica na Grécia (Antoniou et al. 2004); no Irã foi encontrada *L. tropica* em lesão oral e *L. major* em lesão nasal (Shirian et al. 2012); três pacientes do Sudão, diagnosticados com leishmaniose cutânea e sem sintomas de LV, apresentaram *L. donovani* e *L. major* em amostras de aspirado de lesão ulcerada localizada (Babiker et al. 2014);

No Novo Mundo, as espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foram encontradas em lesões distintas de um paciente (Silveira et al. 1984) e em outro relato, *L. braziliensis* e *L. donovani* encontradas em lesão cutânea e medula óssea respectivamente (Oliveira Neto et al. 1986) ambos no Brasil; na Bolívia um paciente com leishmaniose cutânea difusa apresentou *L. amazonensis* e *L. infantum* na mesma lesão, explicando assim as características atípicas encontradas nas lesões cutâneas (Martinez et al. 2002); *L. mexicana* e *L. braziliensis*, e *L. amazonensis* e *L. mexicana* em lesões de pacientes com LC no México (Monroy-Ostria et al. 2014).

Foram relatados também alguns casos de coinfeção em cães naturalmente infectados no estado do Rio de Janeiro com *L. braziliensis* em lesão cutânea e *L. infantum* no sangue, linfonodos e baço (Madeira et al. 2005, 2006; Silva et al. 2011; Pires et al. 2014); em Minas Gerais infecção mista com *L. infantum* em amostras de medula óssea e *L. braziliensis* em lesão no focinho e na pele da orelha (Quaresma et al. 2011). Em um estudo recente de Souza et al. (2019) com cães em Belo Horizonte (MG), utilizando PCR-ITS1 *nested* seguido de RFLP com a enzima *HaeIII* e *RsaI*, foram encontrados 17/30 animais infectados por *L. infantum*, 4/30 por *L. amazonensis*, 1/30 por *L. braziliensis* e 8/30 com perfil de infecção mista. Duas amostras com perfil misto foram sequenciadas, em uma delas foi observada a presença das espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e na outra, as três espécies. Indicando que identificar as espécies de *Leishmania* infectando cães é essencial para o diagnóstico adequado e para a compreensão e orientação epidemiológica das medidas de controle. A proximidade dos cães e roedores nativos pode estar promovendo tais infecções com agentes etiológicos da LT. O significado epidemiológico desses achados ainda não foi esclarecido, uma vez que a importância do cão como reservatório de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* permanece desconhecida.

#### 1.4 Diagnóstico das leishmanioses e a LAMP

O tratamento efetivo e o controle das leishmanioses dependem de um diagnóstico acurado e precoce, de maneira a evitar o desenvolvimento de doença crônica e/ou de lesões desfigurantes (Van der Meide et al. 2005). Diferentes métodos de diagnóstico associados são usados para a confirmação da doença, sendo estes o parasitológico, o molecular e o imunológico.

Existem diversos métodos parasitológicos utilizados para demonstrar os parasitos em diferentes órgãos e tecidos, estes incluem: avaliação citológica de esfregaços ou impressões em lâminas fixadas e coradas, que podem ser realizados a partir de materiais biológicos como pele, aspirados de medula óssea, baço e linfonodos utilizando microscópio óptico à procura de amastigotas; pode ser também realizada análise histopatológica e/ou imuno-histoquímica de lâminas devidamente preparadas e coradas à procura de amastigotas bem como avaliação de processos patológicos em diversos tecidos utilizando microscópio óptico, sendo estes considerados métodos parasitológicos diretos. Um método parasitológico indireto é a utilização de culturas “in vitro” de aspirados e fragmentos de órgãos em meio de cultura bifásicos que são mantidas sob condições controladas de temperatura para o desenvolvimento de promastigotas, sendo este mais utilizado na pesquisa para posterior análise molecular com identificação de espécie (Alvar et al. 2004; Tafuri et al. 2001; Saridomichelakis et al. 2005; Reithinger & Dujardin 2007; Maia & Campino 2008).

Os métodos moleculares são inovadores para o diagnóstico das leishmanioses e dentre eles podemos destacar a amplificação de alvos gênicos utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (PCR multiplex, PCR *nested*, qPCR) (Britto et al. 2005; Cupolillo, 2005) e também a PCR seguida de sequenciamento de diferentes genes e de regiões do genoma (Van der Auwera and Dujardin 2015). Esses são considerados muito sensíveis, capazes de detectar o alvo mesmo que ele esteja em quantidade mínima nas amostras clínicas analisadas, além disso, as amostras podem ser coletadas de maneira menos invasiva, gerando um resultado seguro num pequeno intervalo de tempo (Ikonopoulou et al. 2003; Silva et al. 2004). Podem ser aplicados em diversas amostras biológicas como aspirados de medula óssea, linfonodos e baço; tecidos com lesão; conjuntiva e sangue periférico (Manna et al. 2004; Strauss-Ayali et al. 2004; Maia & Campino 2008). A PCR em conjunto com a técnica de RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição) utilizando a enzima de restrição *HaeIII* é utilizada para identificar a espécie do parasito, combinando uma elevada sensibilidade para

detectar *Leishmania* diretamente em amostras clínicas (Schönian et al. 2003; Volpini et al. 2004; Andrade et al. 2006).

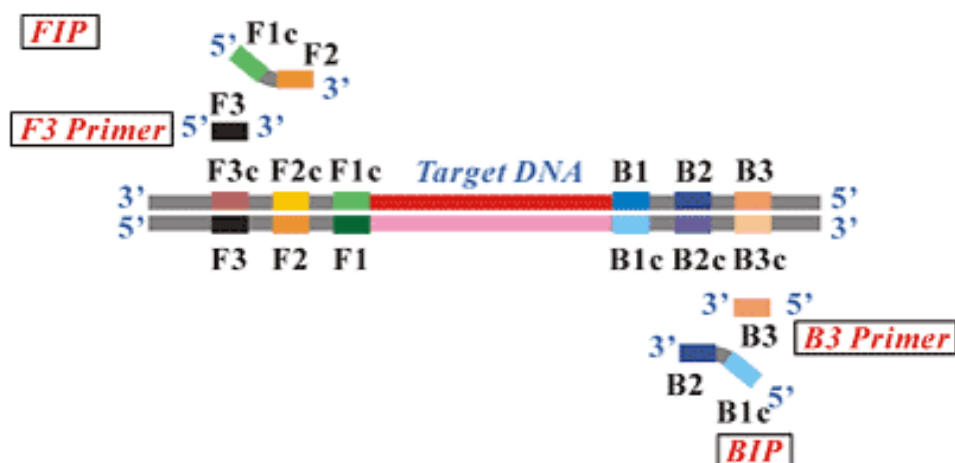
Estes métodos baseados em PCR requerem instrumentos de alta precisão para amplificação ou métodos elaborados para a detecção dos produtos amplificados, e muitas vezes são difíceis de adaptar para uso clínico de rotina. Além disso, a PCR tem várias desvantagens intrínsecas, como a necessidade de ciclos térmicos e a análise pós-PCR demorada, o que pode levar à contaminação laboratorial (Parida et al. 2008). A identificação da espécie concomitante ao diagnóstico é muito importante na epidemiologia e controle das leishmanioses, e, apesar de todas as vantagens destas técnicas, ainda é necessário o desenvolvimento de métodos rápidos, específicos, de baixo custo e que possam ser utilizados rotineiramente.

Notomi et al. (2000) desenvolveram um novo método de amplificação do DNA, denominado LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*), realizado em uma temperatura constante, sendo rápido, eficiente, altamente específico e sensível. A técnica de LAMP utiliza de quatro a seis iniciadores, em conjunto com a enzima Bst DNA polimerase, capaz de amplificar grandes quantidades de DNA dentro de 30 a 60 minutos, temperatura estável entre 60-68°C, usando equipamento básico, como banho-maria ou banho seco. É possível a visualização do resultado com métodos simples de detecção, sem a necessidade do uso de géis ou equipamentos sofisticados para sua execução, tornando-o um método de baixo custo, sendo atraente para aplicação no campo (Notomi et al. 2000; Adams et al. 2010).

Para a visualização do resultado da reação de LAMP, são comumente utilizados corantes intercalantes de DNA, que podem ser adicionados antes ou depois da amplificação, ou também através da turbidez do pirofosfato de magnésio, que pode ser observada após a amplificação. Isso no próprio tubo onde foi realizada a reação (Mori et al. 2001). O produto amplificado pode ser melhor visualizado na presença de corante fluorescente, como o brometo de etídio, SYBR®, calceína, dentre outros, utilizando luz ultravioleta (Parida et al. 2008). Outro corante utilizado nas reações de LAMP com visualização da amplificação a olho nu é o verde malaquita, que é um corante catiônico não fluorescente, acrescentado antes da amplificação, sem inibir a eficiência da mesma. Amostra de cor azul clara significa reação positiva e amostra transparente reação negativa (Nzelu et al. 2014). O corante azul de hidroxinaftol também é utilizado e adicionado nas reações de LAMP antes da amplificação. É um corante que reage com os íons magnésio, e uma reação positiva é indicada por uma mudança de cor, de violeta para azul (Goto et al. 2009).

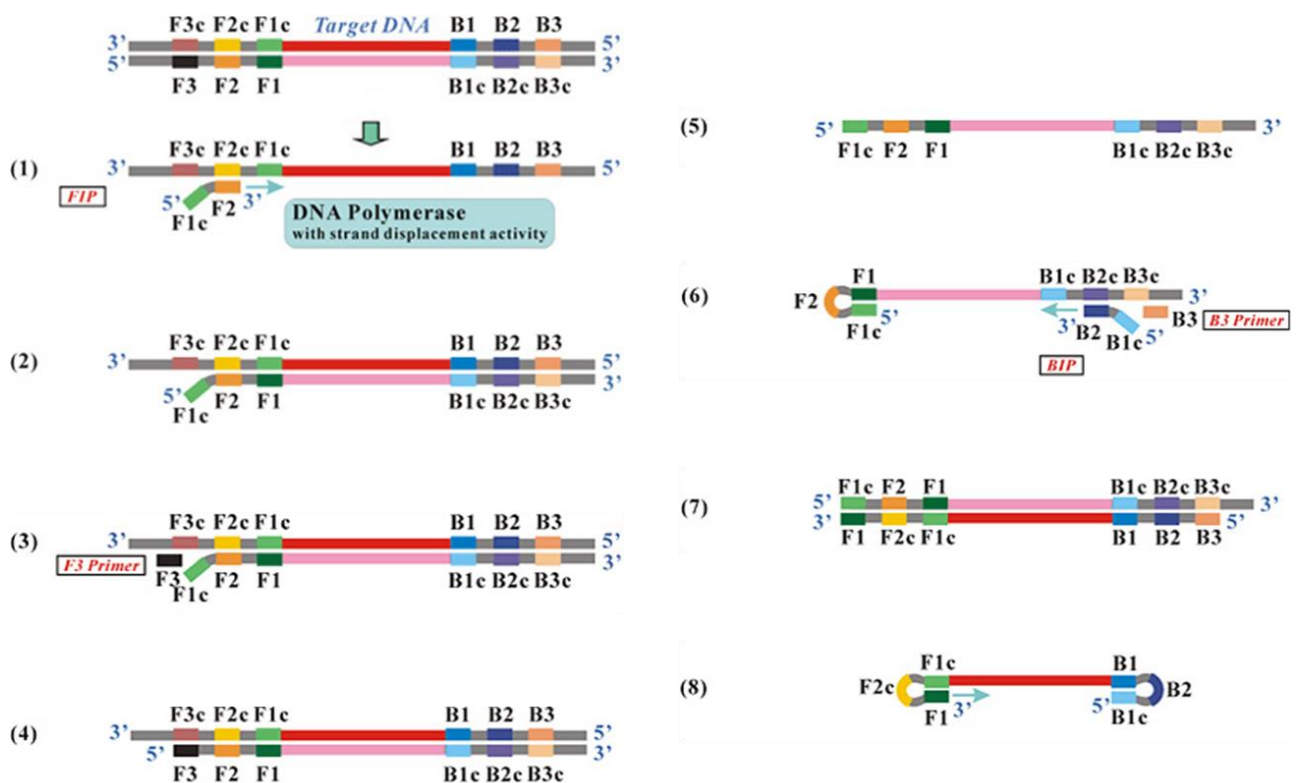
Inicialmente, no LAMP utilizavam-se apenas 2 pares de iniciadores, sendo um par de iniciadores internos, usualmente chamados de FIP e BIP (*foward inner primer* e *backward inner*

*primer*) e outro par de iniciadores externos F3 e B3 (*outter primers*), desenhados a partir da sequência de DNA que se deseja amplificar, sendo específicos para seis regiões distintas da sequência alvo (figura 1) (Notomi et al. 2000).



**Figura 1:** Localização dos quatro iniciadores (FIP, F3, BIP e B3) e as seis regiões da sequência alvo correspondente (F1c, F2c, F3c, B1c, B2c e B3c). O FIP na região F2 (na extremidade 3') que é complementar à região F2c e na mesma sequência que a região F1c na extremidade 5'; F3 na região F3 que é complementar à região F3c; BIP na região B2 (na extremidade 3') que é complementar à região B2c e na mesma sequência da região B1c na extremidade 5' e B3 na região B3 que é complementar à região B3c (Eiken Chemical Co., Ltd.).

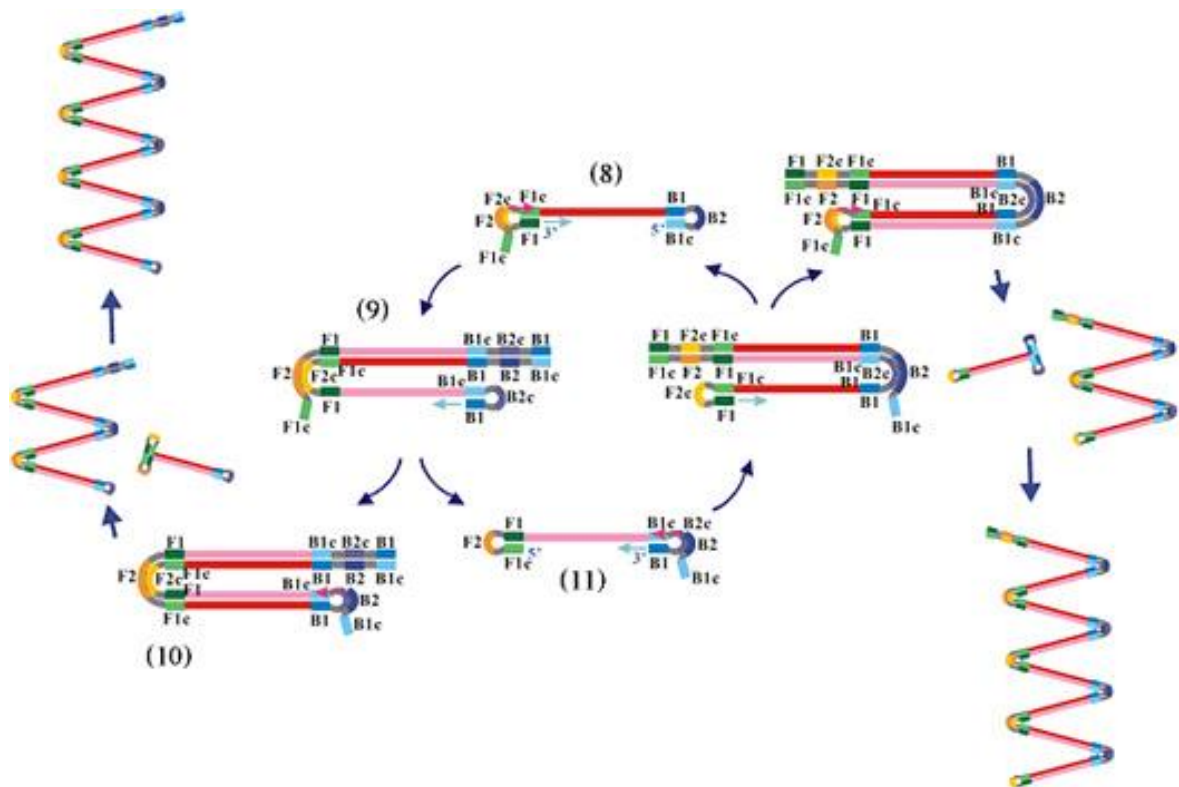
O princípio do LAMP se baseia em uma reação de deslocamento de fitas pela Bst DNA polimerase contendo duas etapas: não cíclica e cíclica. A etapa não cíclica se inicia com a Bst DNA polimerase deslocando uma das fitas do DNA de dupla fita e liberando fitas simples, sem a necessidade de altas temperaturas para desnaturação. Ocorre então, a ligação dos iniciadores na fita simples de DNA a partir deste deslocamento, iniciando-se pela extremidade 3' da região F2 do FIP e síntese da fita na região F2c. Em seguida, o F3 se liga à região F3c, iniciando a síntese de DNA novamente, ocasionando no deslocamento da fita formada anteriormente a partir da ligação do FIP e, nesta fita que foi liberada, ocorre a formação do *loop* entre as regiões complementares F1c e F1. Nesta fita ocorre a ligação do BIP e em seguida a síntese da nova fita que desfaz o *loop* formado pelo FIP, deixando-a linear. Em seguida, ocorre a ligação do B3 e o deslocamento da fita originada a partir de BIP, formando um fragmento com *loops* em cada extremidade (figura 2), que são necessários para o início da etapa cíclica da reação de LAMP (Notomi et al. 2000; Parida et al. 2008).



**Figura 2:** Na etapa não cíclica, inicialmente ocorre a separação da dupla fita de DNA pela ação da enzima Bst DNA polimerase e ligação do FIP (1); síntese da fita a partir de FIP (2); ligação do F3 (3); síntese da fita a partir de F3 e deslocamento da fita formada anteriormente por FIP (4); a fita deslocada sintetizada a partir de FIP (5); ocorre ligação de BIP, a fita é sintetizada e, em seguida, liga-se B3 (6); formação da nova fita a partir de B3 e a estrutura de *loop* é linearizada (7); separação da fita em que as extremidades são FIP e BIP que formam os *loops* para, posteriormente, iniciar a etapa cíclica (Eiken Chemical Co., Ltd.).

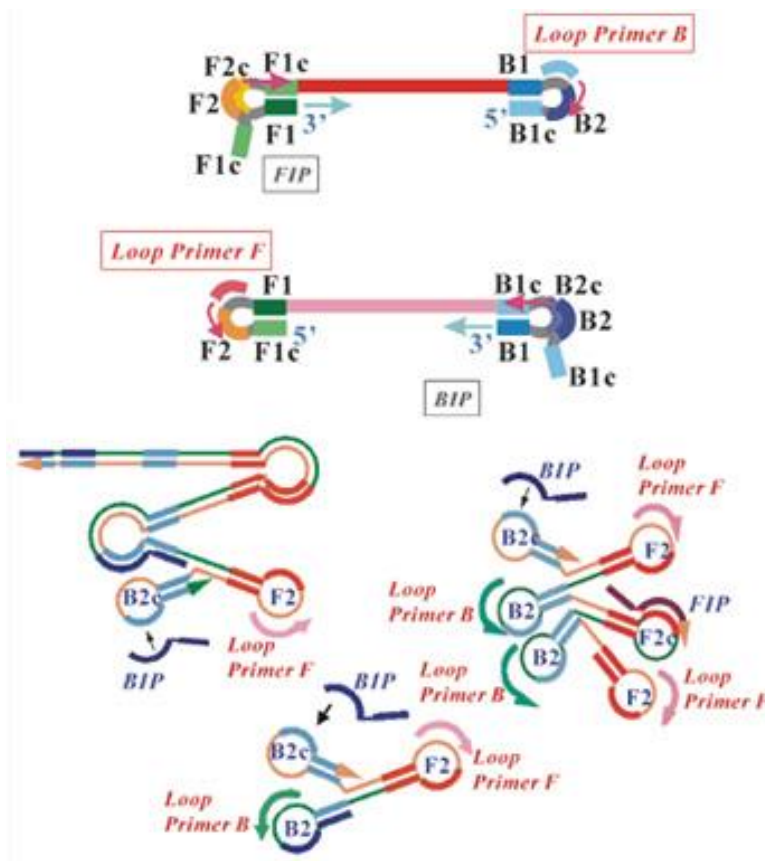


A etapa cíclica se inicia com a ação da enzima em uma das extremidades do *loop*, que serve de molde para a síntese, já que F1 e F1c são complementares. Posteriormente, FIP se liga à região F2c iniciando a síntese de uma nova fita. Em seguida, ocorre amplificação da outra extremidade do *loop*, onde B1 e B1c são complementares e também ocorre deslocamento da fita sintetizada anteriormente, liberando duas estruturas, uma em formato de haltere, a qual ocorrerá a síntese a partir de uma extremidade que serve de molde para amplificação através das regiões complementares, em seguida a ligação de BIP com deslocamento da fita anterior e síntese de nova fita, a qual ocorre repetidamente alternando-se os iniciadores e extremidades; e outra estrutura a qual será feita ligações dos iniciadores alternativamente e deslocamento das fitas recém sintetizadas formando, assim, várias estruturas de diferentes tamanhos, todas contendo a sequência alvo. Nesta etapa, é possível a obtenção de várias cópias do alvo, com múltiplos *loops* em uma mesma fita (figura 3), em escala de  $10^9$ , em menos de 1 hora (Notomi et al. 2000; Parida et al. 2008).



**Figura 3:** A etapa cíclica se inicia a partir da estrutura em formato de haltere (8); ocorre a síntese a partir de um dos *loops* e ligação do FIP que inicia a síntese de uma nova fita e deslocamento da fita anterior (9); formação da estrutura que inicia o ciclo de alongamento que ocorrerá ligação dos iniciadores de maneira alternada originando estruturas de tamanhos variados, todos contendo a sequência alvo (10) e formação de estruturas em formato de haltere que irão iniciar novamente as etapas (8) e (9) do ciclo de amplificação (11) (Eiken Chemical Co., Ltd.).

Posteriormente foram criados mais um par de iniciadores, denominados *Loop primers* (LpF e LpB), os quais aceleram a reação, pois formam novos locais para início da amplificação de DNA, garantindo maior especificidade à técnica (figura 4). Observou-se uma redução de 33% a 50% do tempo de amplificação, podendo ter alta amplificação em apenas 30 minutos (Nagamine et al. 2002).



**Figura 4:** Amplificação utilizando os *Loop primers* (LpB e LpF). As posições destes iniciadores são entre as regiões de B1 e B2 ou F1 e F2 da estrutura semelhante a um haltere, fornecendo um número aumentado de pontos de partida para a síntese de DNA, em que observa-se um produto amplificado contendo seis *loops*. No método LAMP original, quatro desses *loops* não seriam usados, mas através do uso de *Loop primers*, todos os *loops* de fita simples podem ser usados como pontos de partida para a síntese de DNA (Eiken Chemical Co., Ltd.).

Diversos trabalhos têm utilizado a técnica de LAMP na detecção de DNA de *Leishmania* em amostras de humanos, cães e vetores. Dentre eles, alguns utilizaram iniciadores na reação capazes de amplificar amostras com diferentes espécies de *Leishmania* simultaneamente, ou seja, diagnóstico de *Leishmania* spp. (Adams et al. 2010; Nzelu et al. 2014; Sriworarat et al.

2015; Abbasi et al. 2016; Nzelu et al. 2016; Imai et al. 2017; Verma et al. 2017; Tiwananthagorn et al. 2017; Adams et al. 2018; Mukhtar et al. 2018) e em outros trabalhos, os iniciadores utilizados na reação são espécie-específicos. Dentre eles, específicos para *L. donovani* (Takagi et al. 2009; Khan et al. 2012; Verma et al. 2013; Kothalawala & Karunaweera 2016) e *L. infantum* (Chaouch et al. 2013; Ghasemian et al. 2014; Gao et al. 2015). Verma et al. (2017) desenvolveram uma técnica de LAMP utilizando três pares de iniciadores que tiveram como alvo a região do kDNA de *L. donovani* para detecção da infecção em amostras de pacientes com LV, PKDL e LC. A técnica foi capaz de amplificar amostras das espécies *L. donovani*, *L. tropica* e *L. major*, com alta sensibilidade na detecção de *L. donovani* (1fg de DNA). Apresentou sensibilidade de 100% em amostras de pacientes com LV; 97% em pacientes com PKDL e 80% em pacientes com LC, com especificidade de 100%, quando comparado às amostras controles.

Quando comparada a PCR, a técnica de LAMP é mais rápida e com menor custo, oferecendo uma sensibilidade melhorada e uma maior tolerância aos inibidores presentes em várias amostras clínicas (Mori & Notomi 2009; Kaneko et al. 2007). Assim, tem sido demonstrado que a LAMP é uma técnica molecular promissora para o diagnóstico específico de infecções por *Leishmania*. A maioria desses trabalhos utilizou como alvo para desenho dos iniciadores, as regiões do minicírculo do kDNA ou do gene 18S do RNAr de *Leishmania*. Até onde sabemos, não existe ainda trabalho utilizando a reação de LAMP específica para a espécie *L. amazonensis*.

A PCR em tempo real (qPCR) é também uma alternativa para diagnóstico molecular específico de *Leishmania*. Weirather et al. (2011) testaram vários conjuntos de iniciadores para identificar diversas espécies do parasito. Estas foram, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* e *L. amazonensis*. Para observar essa diferenciação de espécies, se basearam nas curvas de *melting*. Para *L. amazonensis*, por exemplo, o primeiro conjunto de iniciadores utilizados, não foi capaz de diferenciar *L. amazonensis* das espécies do complexo *L. donovani*, sendo necessário a utilização de um segundo conjunto, ambos da região do minicírculo do kDNA, para a confirmação e validação do resultado. Apesar das vantagens da técnica de qPCR, esta necessita de reagentes e equipamentos com alto custo, além de laboratório com capacidade técnica para sua realização e correta análise dos resultados.

Os métodos de diagnóstico imunológicos são empregados para detecção de resposta imune celular ou humoral, sendo a resposta celular mais adequada para LT e a humoral para LV. O método para detecção de resposta celular utilizado para diagnóstico da LT é o teste intradérmico ou intradermorreação de Montenegro, baseado na hipersensibilidade tardia. Os

métodos sorológicos são utilizados para detecção de resposta humoral, principalmente, no diagnóstico da LV, devido aos altos níveis de anticorpos nos pacientes com essa forma da doença (Burns et al. 1993).

Os métodos sorológicos têm vantagens significativas para o diagnóstico das leishmanioses, pois permitem a detecção precoce da infecção antes do aparecimento dos sintomas, não são invasivos e são facilmente automatizados, permitindo a análise simultânea de um grande número de amostras (Souza et al. 2013; Mendes et al. 2013). Os mais utilizados são: *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste imunocromatográfico. Sendo o último método, preconizado pelo Ministério da Saúde no Programa de Controle da Leishmaniose Visceral para triagem de cães (DPP-LVC®) e o ELISA como confirmatório (EIE-LVC®).

O ELISA é uma ferramenta importante no diagnóstico das leishmanioses em comparação com os métodos utilizados para revelar diretamente parasitos em esfregaços de tecido, que são invasivos, necessitam de conhecimentos consideráveis e são inadequados para uso em vigilância epidemiológica (Pereira et al. 2012; Kumar et al. 2012). É considerado um método com boa sensibilidade e de especificidade dependente do antígeno utilizado e, embora vários antígenos venham sendo testados (Soto et al. 1996; Sundar & Rai 2002; Singh & Sivakumar 2003), o antígeno total, derivado do lisado de promastigotas de *Leishmania* spp., é o mais usado, e a ocorrência de resultados falso-positivos pode ser recorrente (Romero et al. 2005; Cataldo et al. 2010; Souza et al. 2013). Várias proteínas recombinantes estão sendo testadas para o diagnóstico da LV utilizando o ELISA. O antígeno recombinante K39, é usado para a realização da técnica, apresentando um menor número de reações cruzadas, quando comparado à utilização do antígeno bruto (Carvalho et al. 2003).

Para a LT, apesar dos baixos níveis de anticorpos, estudos utilizando proteínas recombinantes tem demonstrado uma maior sensibilidade desse método quando comparado aos métodos parasitológicos (Weigle et al. 1987; Goto et al. 2010; Souza et al. 2013). Menezes-Souza et al. (2014) utilizaram a proteína HSP83.1 recombinante da espécie *L. braziliensis*, e também três peptídeos selecionados após o mapeamento de epítopos de células B para diagnóstico por ELISA de amostras de pacientes com LT e LV e cães com LV. A técnica apresentou baixo número de falsos positivos, quando comparado ao uso de antígeno bruto de *L. braziliensis* ou ao kit EIE-LVC®, além de alta sensibilidade e especificidade. Estudo semelhante foi realizado utilizando a proteína catepsina L-like (CatL) de *L. braziliensis*. CatL recombinante, mostrou ótimos resultados no imunodiagnóstico de LT, com 95,7% de especificidade e 96,9% de sensibilidade, utilizando 65 amostras de pacientes (45 com a forma

cutânea e 20 com a forma mucocutânea), porém sem identificação da espécie causadora da infecção (Menezes-Souza et al. 2015).

Uma inovação na técnica de ELISA vem sendo testada pelo nosso grupo de pesquisa com o uso de antígenos recombinantes e revelação por quimioluminescência, utilizando o luminol como substrato. Como vantagens, a realização e obtenção dos resultados foi mais rápida e com performance superior quando comparada ao ELISA convencional. Por exemplo, para diagnóstico da LT utilizando como antígeno a proteína recombinante C9 em ELISA convencional a sensibilidade e especificidade observada foi 64,7% e 72%, respectivamente, e quando revelado de forma quimioluminescente (ELISA-CLIA) obteve-se aumento da sensibilidade para 92% e da especificidade para 83% (Leite 2019).

Nenhum dos métodos de detecção de resposta imune até o momento são específicos para uma única espécie de *Leishmania* que esteja envolvida na infecção, e a maioria deles, tem reação cruzada com outros protozoários, como o *T. cruzi*, por exemplo. No entanto, foi demonstrado que em infecções por *T. cruzi*, foi possível selecionar peptídeos específicos para cada cepa utilizada no estudo: Colombiana (TcI); CL Brener (TcVI) e Y-(TcII), sendo potenciais alvos para sorotipagem de infecções por *T. cruzi* (Mendes et al. 2013), sugerindo que um diagnóstico sorológico espécie-específico é possível.

## 1.5. Imunoproteômica

Avanços em imunoproteômica como eletroforese em gel bidimensional (2-DE), espectrometria de massa, predição de epítomos de células B e síntese de peptídeos permitiram aos pesquisadores descobrir novos biomarcadores para o diagnóstico de doenças. Tem sido demonstrado que uma abordagem imunoproteômica pode ser muito eficiente na identificação de antígenos e assim, promissora para contribuir com a melhoria nos métodos de diagnóstico sorológico das leishmanioses.

Dea-Ayuela et al. (2006) realizaram estudo utilizando 2-DE de extrato de promastigotas de *L. infantum*, seguido de Western Blot com soro de coelhos imunizados e análise por EM, e identificaram várias proteínas antigênicas relevantes. Numa abordagem semelhante, foram identificados vários antígenos de *L. donovani* utilizando soros e parasitos isolados de pacientes indianos permitindo concluir que a abordagem proteoma-sorologia produz uma compreensiva e altamente resolvida representação da antigenicidade de *L. donovani* e da especificidade da resposta imune anti-leishmania em pacientes com LV

(Forgber et al. 2006). Recentemente, foi realizada uma triagem de várias proteínas da membrana de *Leishmania* reativas à urina como potenciais candidatos a biomarcadores da LV (Ejazi et al. 2018).

Nosso grupo de pesquisa vem utilizando a imunoproteômica com sucesso. Inicialmente identificamos novos antígenos para diagnóstico e vacina da leishmaniose visceral canina (LVC) (Costa et al. 2011). Este estudo teve desdobramentos que culminaram com a identificação de peptídeos (Faria et al. 2011) e de proteínas multiepitopos (Faria et al. 2015) que permitem um diagnóstico precoce e eficiente da LVC, sendo até comparável a diagnóstico por qPCR (Faria et al. 2017). Além disso, considerando que os cães eventualmente, são hospedeiros de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, realizamos imunoproteômica e rastreamento por bioinformática para pesquisar proteínas dessas espécies que fossem reativas a soros caninos e também secretadas pelo parasito. Assim, podem ser desenvolvidos métodos para a detecção de antígenos, isto poderia ser útil como uma abordagem para o diagnóstico de qualquer infecção por espécies de *Leishmania* e utilizando diferentes amostras de fluidos corporais (Lima et al. 2016). Mais recentemente, tendo como foco o diagnóstico da LV em humanos, realizamos a identificação de proteínas antigênicas frente a soros humanos e que são também diferencialmente expressas entre as espécies de *Leishmania* mais frequentes no Brasil: *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (Lima et al. 2017). No entanto, nenhum destes antígenos são candidatos para um diagnóstico espécie-específico, permanecendo em aberto essa lacuna.

Pelo exposto, destacamos que no Brasil, áreas de sobreposição entre diferentes formas clínicas e agentes etiológicos das leishmanioses são frequentes, tornando bastante provável a possibilidade de infecções mistas e também de equívoco no diagnóstico, podendo influenciar no controle e tratamento. Os métodos de diagnósticos utilizados na rotina atualmente, não são capazes de fazer essa diferenciação das espécies envolvidas, o que seria de grande valia, visto a importância da espécie *L. amazonensis*. Com isso, estudos que visem aprimorar os métodos de diagnóstico para que sejam mais específicos tornam-se necessários, sendo de grande importância na epidemiologia e controle da doença.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver métodos de diagnóstico específico para infecções por *L. amazonensis* utilizando técnicas moleculares e sorológicas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Padronizar e avaliar a especificidade e sensibilidade analítica da técnica de LAMP para diagnóstico específico de infecções por *L. amazonensis* utilizando amostras de diferentes espécies de protozoários;
- Comparar a LAMP com outras técnicas moleculares (PCR e qPCR) utilizando amostras clínicas de pele de animais experimentalmente infectados com *L. amazonensis* e *L. infantum*;
- Determinar o perfil imunoproteômico de *L. amazonensis* frente a soros de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis* e *L. infantum*;
- Selecionar e identificar proteínas de *L. amazonensis* reativas exclusivamente aos soros de hamsters experimentalmente infectados com a mesma;
- Padronizar um teste de ELISA com proteína recombinante identificada.

### 3 Materiais e métodos

#### 3.1 Amostras biológicas

a) **Pele e soro** – Foram utilizadas amostras biológicas (pele e soro) de trabalho anterior (Celeste et al. 2017) cujo projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) em 20/08/2013 com protocolo nº 129/2013 (anexo). No referido trabalho, hamsters da espécie *Mesocricetus auratus* do mesmo sexo e idade, foram divididos em grupos de acordo com a via de inoculação, a espécie de parasito inoculada e o tipo de infecção, se com uma espécie ou duas. Todos foram infectados com  $10^7$  promastigotas/animal e duas vias de inoculação foram utilizadas para cada tipo de infecção, a subcutânea e a intraperitoneal. A tabela 1 mostra a composição dos grupos experimentais. Os animais foram experimentalmente infectados com as cepas IFLA/BR/1967/PH8 de *L. amazonensis* e MCAN/BR/2002/BH401 de *L. infantum*. No presente trabalho, foram utilizadas amostras obtidas aos 90 d.a.i. (dias após a infecção) que estavam estocadas em freezer -80°C.

**Tabela 1:** Composição dos grupos experimentais de acordo com via e local da inoculação e espécie utilizada.

GRUPO	VIA / LOCAL	INÓCULO
1 (n=9)	Subcutânea / pata traseira esquerda	<i>L. infantum</i>
2 (n=9)	Subcutânea / pata traseira direita	<i>L. amazonensis</i>
3 (n=9)	Subcutânea / pata traseira esquerda	<i>L. infantum</i>
	pata traseira direita	<i>L. amazonensis</i>
4 (n=9)	Intraperitoneal	<i>L. infantum</i>
5 (n=9)	Intraperitoneal	<i>L. amazonensis</i>
6 (n=9)	Intraperitoneal	<i>L. infantum</i> + <i>L. amazonensis</i>
7 (n=6)	Subcutânea/ Intraperitoneal	Salina

b) **Parasitas** – Amostras de cultura de *L. infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), *L. major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN), *L. mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21), *L. donovani* (MHOM/ET/1967/HU3) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) foram obtidas da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), estas estavam em meio bifásico, NNN



(Novy, McNeal e Nicolle) com *Schneider's* suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após repiques sucessivos, quando as culturas apresentaram aproximadamente  $10^7$  parasitos/ml, estas foram centrifugadas a 2000g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado 3 vezes com PBS (Tampão Salina Fosfato) estéril. Após as lavagens o pellet foi congelado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de DNA. Amostra de cultura de *Trypanosoma cruzi* (clone CL Brener) foi obtida do Laboratório de Biologia do *T. cruzi* e Doença de Chagas, ICB, UFMG. Esta amostra estava em meio LIT, foram realizadas as centrifugações e lavagens como citado anteriormente, e os pellets acondicionados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Todas as amostras de cultura foram obtidas para a realização da padronização da técnica de LAMP, para testar a especificidade da reação.

**c) DNA** - Amostras de DNA de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. infantum* (MCAN/BR/2002/BH401) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram obtidas do Laboratório de Leishmanioses, ICB, UFMG. Amostras de DNA de outros protozoários foram utilizadas: *Babesia canis*, gentilmente cedidas pela professora Dra. Júlia Silveira do Laboratório de Protozoologia Veterinária, ICB/UFMG e *Toxoplasma gondii* (cepa D8) gentilmente cedidas pelo professor Dr. Ricardo Victor do Laboratório de Toxoplasmose, ICB/UFMG. Além disso, foram utilizadas quatro cepas de *L. amazonensis* isoladas de diferentes hospedeiros: MHOM/BR/1987/BA276 e MHOM/BR/75/Josefa, provenientes de pacientes com a forma difusa e cutânea, respectivamente, MCAN/BR/2012/GV01 e MCAN/BR/2012/GV02 de cães com a forma clínica visceral, todas gentilmente cedidas pelo Dr. Rodrigo Soares do Instituto René Rachou (Fiocruz Minas). Estas amostras de DNA também foram obtidas para o teste de especificidade na padronização da reação de LAMP. A tabela 2 mostra a relação das amostras de cultura e de DNA utilizadas.

A extração de DNA das amostras de pele coletadas dos hamsters e das amostras de cultura das diferentes espécies de *Leishmania* e *T. cruzi* foi realizada utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em todas as amostras, foi realizada a quantificação do DNA utilizando o espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific) e realizada eletroforese em gel de agarose (0,8%) com brometo de etídeo ( $1,0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) para observar a integridade das mesmas.

**Tabela 2:** Relação das amostras de cultura e DNA utilizadas para a padronização da técnica de LAMP, indicando a espécie do parasito, procedência e tipo de amostra.

<b>Espécie</b>	<b>Procedência</b>	<b>Tipo de amostra</b>
<i>L. infantum</i> (LPC-RPV) <i>L. major</i> (FRIEDLIN) <i>L. mexicana</i> (BEL21) <i>L. donovani</i> (HU3) <i>L. guyanensis</i> (M4147)	CLIOC (FIOCRUZ)	Cultura
<i>L. amazonensis</i> (PH8) <i>L. infantum</i> (BH401) <i>L. braziliensis</i> (M2903)	Laboratório de Leishmanioses (UFMG)	DNA
<i>T. cruzi</i> (clone CL Brener)	Laboratório de Biologia do <i>T. cruzi</i> (UFMG)	Cultura
<i>B. canis</i>	Laboratório de Protozoologia Veterinária (UFMG)	DNA
<i>T. gondii</i> (D8)	Laboratório de Toxoplasmose (UFMG)	DNA
<i>L. amazonensis</i> (BA276, Josefa, GV01 e GV02)	IRR (Fiocruz Minas)	DNA

### 3.2 Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* (LAMP)

a) **Desenho dos iniciadores** – Para o desenho dos conjuntos de iniciadores foram utilizadas como alvo duas regiões do DNA de *L. amazonensis*: região do minicírculo do kDNA (GenBank: U19810.1) e região do gene 18S do RNAr (GenBank: KF302746.1). As sequências foram submetidas ao software LAMP Designer 1.13 (PREMIER Biosoft International).

b) **Padronização da reação de LAMP** – De maneira geral, cada reação continha: tampão de Reação ThermoPol 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM de KCl, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,1% de Triton X-100), 1,5 mM de cada dNTP, 40 pmol/μL de cada iniciador interno (FIP e BIP), 5 pmol/μL de cada iniciador externo (F3 e B3), 20 pmol/μL de LpF e LpB (*Loop primers*), 0,8 M de Betaína, 8 U da enzima *Bst* DNA polimerase (New England Biolabs) e 1 μL de DNA (concentrações variadas para cada experimento), em um volume final de 20 μL. Controle negativo sem DNA, controle positivo (DNA de *L. amazonensis*) e DNA de hamster não infectado foram utilizados em todos os experimentos. As reações foram incubadas por 40 minutos com diferentes temperaturas testadas: 65°C, 67°C e 68°C e por 10 minutos a 80°C.

Para a observação dos resultados foram utilizados dois métodos. Primeiro realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, seguido da coloração pela prata rápida: 1- solução fixadora (etanol P.A., ácido acético glacial e água destilada) por no mínimo 3 minutos; 2- acrescentou-se solução de nitrato de prata a 10% por 3 minutos; 3- a solução de nitrato de prata foi descartada e o gel lavado com água destilada; 4- solução reveladora (hidróxido de sódio e água destilada) com formaldeído acrescentado no momento do uso até o aparecimento das bandas. Durante o processo de coloração o gel estava em agitação constante. Após a coloração, a solução reveladora foi descartada e o gel colocado novamente em solução fixadora. Os géis foram escaneados utilizando o programa LabScan™.

O segundo método foi por detecção colorimétrica, em que foram utilizados três diferentes corantes: verde malaquita (0,004% e 0,008%) e azul de hidroxinaftol (120μM), testados antes e depois da amplificação e SYBR® Safe (1:100, 1:20 e 1:10) adicionado após a amplificação. O equipamento utilizado para a captura da fluorescência foi o Image Quant™ LAS 500 (GE Healthcare, Madison, WI, USA). Em paralelo foram realizados testes sem corante.

c) **Avaliação da reação de LAMP** – Para testar a especificidade analítica, foram realizadas reações utilizando amostras de DNA (10ng) das espécies *L. amazonensis*, *L. infantum* (cepas BH401 e LPC-RPV), *L. braziliensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani* e *L. guyanensis* e

também de *T. cruzi*, *B. canis* e *T. gondii*. Para o teste de sensibilidade analítica, foram utilizadas diferentes diluições do DNA de *L. amazonensis* (10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg e 100fg) e cada uma dessas diluições foi misturada com 10ng de DNA genômico de hamster não infectado.

Após avaliar a especificidade e sensibilidade da reação, foram utilizadas amostras de DNA de pele dos hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum* e coinfeção, vias intraperitoneal e subcutânea, aos 90 d.a.i. Neste experimento, além de controles negativos (sem DNA e DNA de hamster não infectado) utilizou-se controles *L. amazonensis* e de *L. infantum*.

### 3.3 PCR em tempo real (qPCR)

Para quantificar a carga parasitária na pele dos hamsters infectados com *L. amazonensis* aos 90 d.a.i., foram utilizados iniciadores (Bretagne et al. 2001) que amplificam um fragmento de 90 pares de bases (pb) do gene de cópia única da DNA polimerase de *Leishmania* (GenBank: AF009147): forward: 5'-TGTCGCTTGCAGACCAGATG-3' e reverse: 5'-GCATCGCAGGTGTGAGCAC-3'. Para a construção da curva padrão, foram realizadas diluições seriadas (fator 10) de  $10^6$ - $10^2$  cópias do gene-alvo. A reação com volume final de 10  $\mu$ L é composta por 1,25 pmol de cada iniciador, SYBR GREEN reaction master mix1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 1  $\mu$ L (50ng) de DNA. As condições foram as seguintes: desnaturação inicial à 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão à 60°C por 1 min. Para a quantificação da carga parasitária, os valores de CT (ciclo limiar de quantificação) obtidos para cada amostra foram comparados com os obtidos para a curva padrão correspondente (Bruna-Romero et al. 2001). As reações foram processadas e analisadas utilizando o programa Step One Sequence Detection System (SDS;Applied Biosystems).

### 3.4 Imunoproteômica

#### 3.4.1 Extrato proteico

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa PH8) foram cultivadas e mantidas em meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico, em estufa B.O.D a 26°C. Foram realizados repasses sucessivos para o crescimento das culturas e obtidos no mínimo três cultivos independentes e simultâneos na fase exponencial de crescimento. As culturas foram

lavadas três vezes com meio de cultura RPMI sem soro fetal, por meio de centrifugações a 2000g, por 10 minutos, e os pellets acondicionados em freezer -80°C.

A extração de proteínas foi realizada ressuspendendo os parasitos em tampão de lise (8 M uréia, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 65mM dithiothreitol (DTT), 40 mM Tris base) e 1% de “MIX” de inibidor de protease (GE Healthcare, San Francisco, CA). Em seguida, as amostras foram incubadas por 1-2 horas à temperatura ambiente sob agitação. Após esse período, as amostras passaram por um processo de lise mecânica utilizando uma agulha 26G e o conteúdo foi, então, centrifugado por 30 minutos a 10000g e o sobrenadante aliqüotado e acondicionado em freezer -80°C. As proteínas foram dosadas utilizando o 2D-Quant kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras proteicas foram aplicadas em SDS-PAGE 12% para confirmação da quantificação e integridade das mesmas.

### 3.4.2 Eletroforese bi-dimensional (2-DE)

As amostras proteicas foram diluídas em tampão IEF (8M Uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 0,0025% Azul de Bromofenol), 150µg de proteínas foram imobilizadas nas *strips* de 7cm e 800µg nas *strips* de 18cm, contendo 1 % de IPG buffer (Immobiline™ DryStrip, pH 4–7, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Após hidratação passiva, a focalização isoeétrica se deu com os seguintes parâmetros: passo 1 - 500V por 6h; passo 2 - 1000V por 1h e 30min; passo 3 – 8000V por 2h; passo 4 –8000V, até acumular 40000Vh (para *strips* de 7 cm) ou 64000Vh (para *strips* de 18cm); passo 5 – 500V por 1 h; passo 6 – 500V (*hold*). Após a focalização isoeétrica, as *strips* foram equilibradas com Tampão de Equilíbrio (50 mM de Tris 1,5M pH 8,8, 6M Uréia, 30% Glicerol, 2% SDS, 0,001% Azul de Bromofenol) contendo 10mg/mL de DTT (Ditiotreitol) por 15 minutos sob leve agitação. E posteriormente, com Tampão de Equilíbrio contendo 25mg/mL de IAA (Iodoacetamida) nas mesmas condições. As *strips* foram então transferidas para SDS-PAGE 12% para eletroforese nas seguintes voltagens: 70 volts por 15 minutos e 100 volts até o fim da corrida.

As imagens dos géis corados pelo Coomassie brilliant blue G-250 (Neuhoff 1988) foram digitalizadas utilizando ImageScanner (AmershamBiosciences) e analisadas através do programa Image Master 2D Platinum 5.0 (GE Healthcare).

### 3.4.3 Western blot

Para selecionar os *spots* antigênicos, utilizamos a técnica de western blot (WB) em duas situações distintas. Primeiramente, foi realizada a padronização do WB para definir as melhores

condições e diluições dos anticorpos primários e secundários. Para isso, foram utilizados 40µg do extrato proteico de *L. amazonensis* por canaleta, separados através de SDS-PAGE 12%, seguida de transferência para membrana de nitrocelulose (0,45µm) e incubada com uma solução de bloqueio (5% de leite desnatado em PBS/Tween 0,01%) overnight (aproximadamente 18h). A membrana foi cortada em tiras, individualizando cada canaleta, e essas foram incubadas com anticorpo primário, que foram *pools* de soros de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum* e controle não infectado, todos testados nas seguintes diluições: 1:50, 1:100 e 1:200, em solução de bloqueio por 1h. Foram realizadas 3 lavagens por 10 minutos com PBS/Tween 0,05%. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de hamster marcado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), testado nas diluições 1:1000, 1:2000 e 1:2500, também em solução de bloqueio por 1h. As lavagens foram realizadas nas mesmas condições anteriores. A revelação foi feita por método colorimétrico utilizando DAB (diaminobenzidina), α-4-cloronaftol e peróxido de hidrogênio durante cinco minutos e posterior lavagem com água destilada.

Após a padronização do WB, a seleção das proteínas antigênicas foi realizada a partir de fracionamento do extrato proteico de *L. amazonensis* por eletroforese bi-dimensional 2-DE como descrito no item 4.4.2 e realização do WB como descrito anteriormente. As membranas foram digitalizadas utilizando o ImageScanner (Amersham Biosciences) e as imagens analisadas por meio do programa Image Master 2D Platinum 5.0 (GE Healthcare).

Foram realizados três experimentos independentes, cada um deles utilizando 4 géis 2-DE com *strips* de 7cm. Destes, um foi corado com Coomassie brilliant blue G-250 (Neuhoff 1988) e os outros transferidos para a membrana de nitrocelulose para a realização do WB. Quando o coeficiente de correlação entre as imagens das membranas foi  $\geq 0,8$  os experimentos foram considerados com boa repetibilidade, daí foram então realizados os mesmos experimentos utilizando *strips* de 18cm.

#### **3.4.4 Seleção e identificação das proteínas antigênicas**

Imagens dos géis do extrato proteico de *L. amazonensis* e das membranas de WB com os diferentes soros, foram sobrepostas para selecionar *spots* reativos exclusivamente à espécie *L. amazonensis* frente aos soros de animais com infecção homóloga. Excluindo, portanto, aqueles reativos a infecção por *L. infantum* e/ou ao grupo não infectado.

Esses *spots* de interesse foram retirados do gel (18cm) manualmente e colocados individualmente em tubos de 1,5ml. Foram lavados três vezes por 15 minutos cada com 400µl

de bicarbonato de amônio a 25mM e 50% v/v de acetonitrila para descoloração. A solução descorante foi retirada e os fragmentos de géis desidratados com solução de acetonitrila por 5min e após os fragmentos secarem, os mesmos foram reidratados com 10µl de tripsina (Promega), 20 ng/µl em 25mM de bicarbonato de amônio por 16h à 37°C para a digestão das proteínas. A solução de tripsina contendo os peptídeos extraídos foi retirada, armazenada em tubos de 0,6ml e os fragmentos dos géis lavados duas vezes por 15 minutos com 30µl de 50% acetonitrila/5% ácido fórmico. Em seguida, o volume da solução com os peptídeos foi reduzido em SpeedVac a um volume de aproximadamente 10µl. Por fim, as soluções concentradas de cada um dos *spots* foram dessalinizadas utilizando coluna C18 de troca reversa Zip-Tip® (C18 resina; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA), os peptídeos foram eluídos da coluna com solução de acetonitrila 50% /ácido trifluoracético 0,1% e congelados a -20°C até o uso.

As amostras foram misturadas à matriz [10mg/mL de R-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Aldrich, Milwaukee, WI) em acetonitrila 50%/ácido trifluoracético 0,1%] e aplicadas na placa *MTP AnchorChip™* 600/384 (Bruker Daltonics) para análise no MALDI/ToF-ToF (Bruker, AUTOFLEX, 3.0). Ambos MS e MS/MS adquiridos com o laser neodmium-doped yttrium aluminum garnet (Nd:YAG) com 200-Hz. Os espectros foram editados usando os programas FlexAnalysis e Biotools. A busca foi realizada através do programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), usando o banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot. Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 100-200ppm, carbamidometilação, máximo de um sítio tríptico de corte não clivado e oxidação da metionina. Apenas proteínas com valores de *score*  $P \leq 0,05$  foram consideradas.

#### **4.5 Produção da proteína recombinante**

Um das proteínas identificadas, coincidentemente já tinha sido anteriormente produzida no Laboratório de Leishmanioses (UFMG) pela técnica do DNA recombinante. Brevemente, foi adquirido comercialmente o gene sintético correspondente à proteína inserido no vetor pET28a-TEV. A construção pET28a-TEV/gene foi então transformada na bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) e em seguida foi realizada a expressão proteica. Ao meio de cultura foi adicionada kanamicina (50 µg/mL), além do pré-inóculo plasmidial (1 colônia em 25 mL de meio). Todo esse inóculo foi mantido sob agitação a 37°C até que a densidade óptica em 600nm atingisse o valor de 0,4. Neste momento, realizou-se a indução da expressão proteica com isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) 1M e monitorou-se a cultura por 4 horas. Após lise

celular através de sonicação (4 ciclos a 40W de 20s, alternados com 20s no gelo) com consequente liberação de todo o conteúdo proteico bacteriano, a proteína recombinante foi purificada em cromatógrafo de alta pressão, utilizando colunas de afinidade (troca iônica com níquel imobilizado nas colunas). Nesse processo, somente são ligadas e eluídas da coluna as moléculas que possuem cauda de histidina, estrutura que foi adicionada às proteínas recombinantes através do vetor pET28a-TEV. O antígeno purificado foi então dialisado em membrana para eliminação da uréia, com posterior liofilização.

#### 4.6 ELISA

Para a realização do ELISA com a proteína recombinante, uma placa de 96 poços (Eppendorf®) foi sensibilizada com a proteína diluída em tampão bicarbonato pH 9,6 [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,5g; NaHCO<sub>3</sub> 2,9g; H<sub>2</sub>O qsp 1L] na concentração de 0,5 µg/poço. A sensibilização ocorreu por 16-18 horas, a 4° C. No dia seguinte foi realizado o bloqueio da placa com solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado e 0,5% de Tween 20, por 1 hora a 37°C. A placa então foi incubada com *pools* de soros de hamsters infectados por *L. amazonensis* (n=9), *L. infantum* (n=9), coinfecção (n=9) com essas duas espécies e não infectados (n=9), em diluição 1:50. A ligação dos anticorpos foi detectada usando anti-IgG de hamster marcado com peroxidase (Abcam) em diluição 1:2000. Soros e conjugados foram diluídos em PBS com 0,5% de leite em pó desnatado e 0,5% de Tween 20, com incubação por 45 minutos, a 37° C. As lavagens, após cada etapa de incubação, foram realizadas 3 vezes com solução de lavagem (PBS e 0,05% de Tween 20) e as placas secas por inversão em papel absorvente. Posteriormente à adição de solução cromógena, obtida pela solubilização de 2mg de OPD em 10mL de tampão citrato-fosfato e 4µL de peróxido de hidrogênio, foi realizada a incubação das placas por 30 minutos, no escuro, fazendo-se a interrupção da reação com o acréscimo de solução de ácido sulfúrico a 4N. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 492nm (MultiskanGo™ ThermoScientific).



## 4 Resultados

### 4.1 Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* (LAMP)

a) **Iniciadores** – Foram desenhados dois conjuntos de iniciadores, um utilizando como alvo a região do minicírculo do kDNA e o outro a região do gene 18S do RNAr, ambos de *L. amazonensis*. Os iniciadores da região do kDNA foram denominados “Lak” e os da região 18S, “La18”. A tabela 3 mostra a sequência dos iniciadores testados na padronização do LAMP. Todos os iniciadores foram confeccionados pela empresa SIGMA® e foram feitas as diluições necessárias para cada par, sendo 40 pmol/μL de cada iniciador interno (FIP e BIP), 5 pmol/μL de cada *primer* externo (F3 e B3) e 20 pmol/μL de LpF e LpB (*Loop primers*).

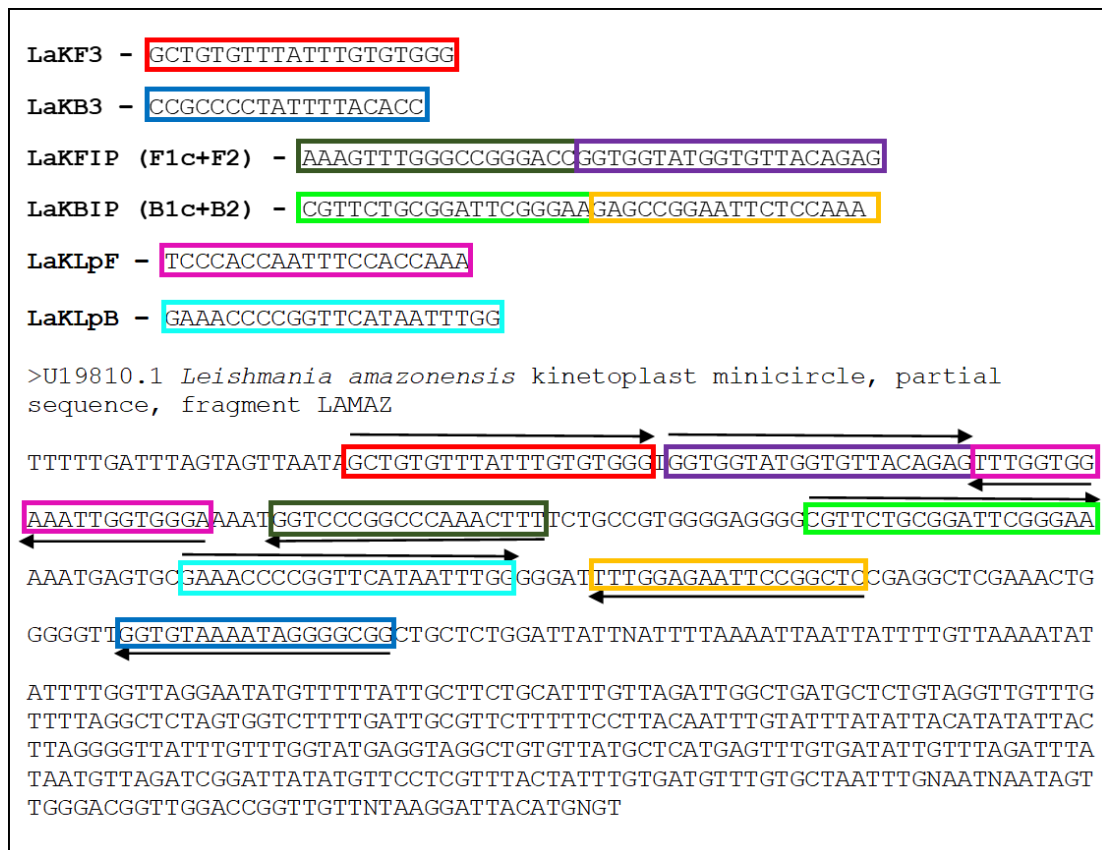
**Tabela 3:** Alvo e sequência dos iniciadores utilizados para padronização da técnica de LAMP específica para *L. amazonensis*.

Alvo	Iniciador	Sequência
Minicírculo kDNA	<u>LaKF3</u>	GCTGTGTTTATTTGTGTGGG
	<u>LaKB3</u>	CCGCCCTATTTTACACC
	<u>LaKFIP (F1c+F2)</u>	AAAGTTTGGGCCGGGACCGGTGGTATGGTGTTACAGAG
	<u>LaKBIP (B1c+B2)</u>	CGTTCTGCGGATTCGGGAAGAGCCGGAATTCTCCAAA
	<u>LaKLpF</u>	TCCACCAATTTCCACAAA
	<u>LaKLpB</u>	GAAACCCCGTTCATAATTTGG
18S RNAr	<u>La18F3</u>	CATGGGATAACAAAGGAGCA
	<u>La18B3</u>	TCTTGGTGCGGTCTAAGA
	<u>La18FIP (F1c+F2)</u>	ACCGAACCGAAGTTGCGATGGTCTATTGGAGATTATGGAGC
	<u>La18BIP (B1c+B2)</u>	TTTAGTGCGTCCGGTGCGCATTCTAGAGGCCGTGA
	<u>La18LpF</u>	GGAAAGCACTTGTCGCAC
	<u>La18LpB</u>	GCCGTAACGCCTTTTCAAC

b) **Padronização da reação de LAMP** – As reações foram testadas para ambos os conjuntos de iniciadores, com as diferentes temperaturas (65°C, 67°C e 68°C) durante 40 minutos. Nos testes iniciais para padronização do conjunto de iniciadores específicos para *L. amazonensis*, foram utilizados controles positivos (DNA de *L. amazonensis* e *L. infantum*), controle negativo sem DNA e DNA de hamster não infectado.

Em todos os testes realizados, as reações com o conjunto de iniciadores da região 18S RNAr, os denominados “La18”, amplificaram amostras de *L. amazonensis*, *L. infantum* e hamster não infectado, sendo então descartados pela falta de especificidade dos mesmos.

Nas reações utilizando o conjunto de iniciadores da região do minicírculo do kDNA, os denominados “Lak”, foram positivas somente amostras de *L. amazonensis*, a 67°C por 40 minutos. Esse conjunto de iniciadores foi o escolhido por sua especificidade para dar continuidade a padronização da técnica de LAMP. A figura 5 mostra os iniciadores selecionados e a localização de cada um na sequência do minicírculo do kDNA de *L. amazonensis* utilizado como alvo.

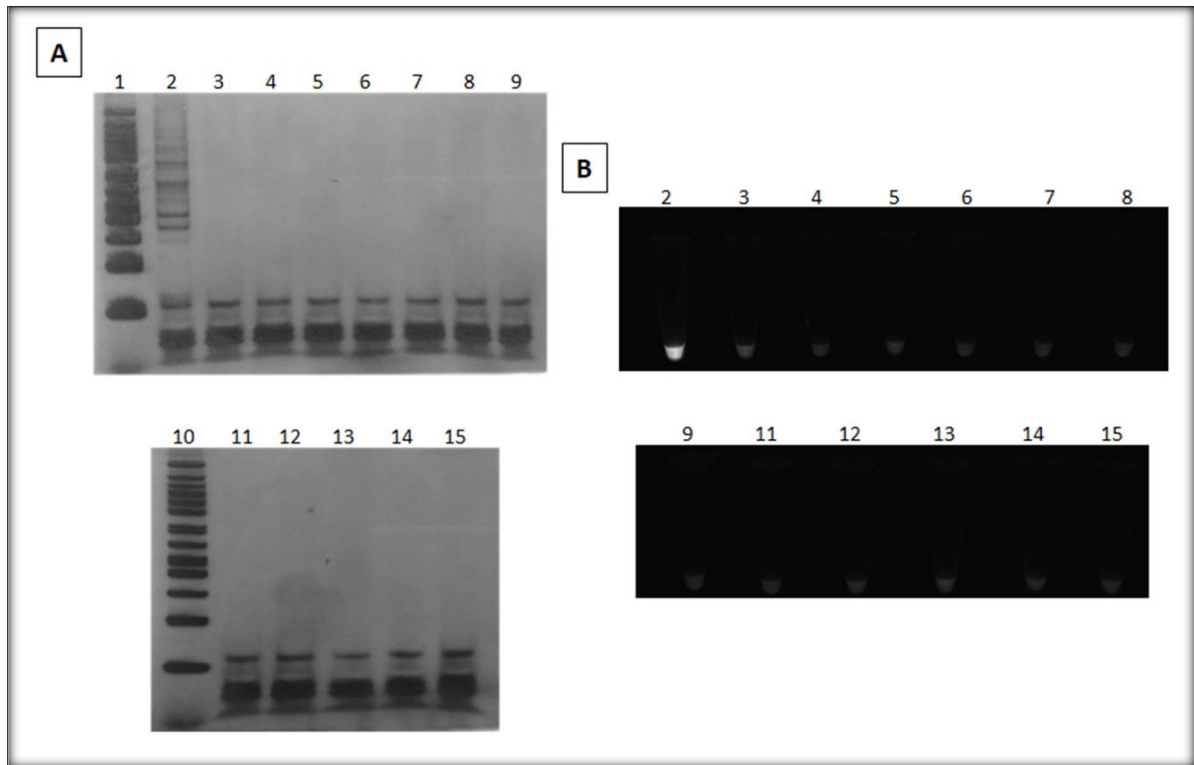


**Figura 5:** Localização dos seis iniciadores na sequência do minicírculo do kDNA de *L. amazonensis* selecionados para a padronização da reação de LAMP. A sequência de cada iniciador está identificada por uma cor.

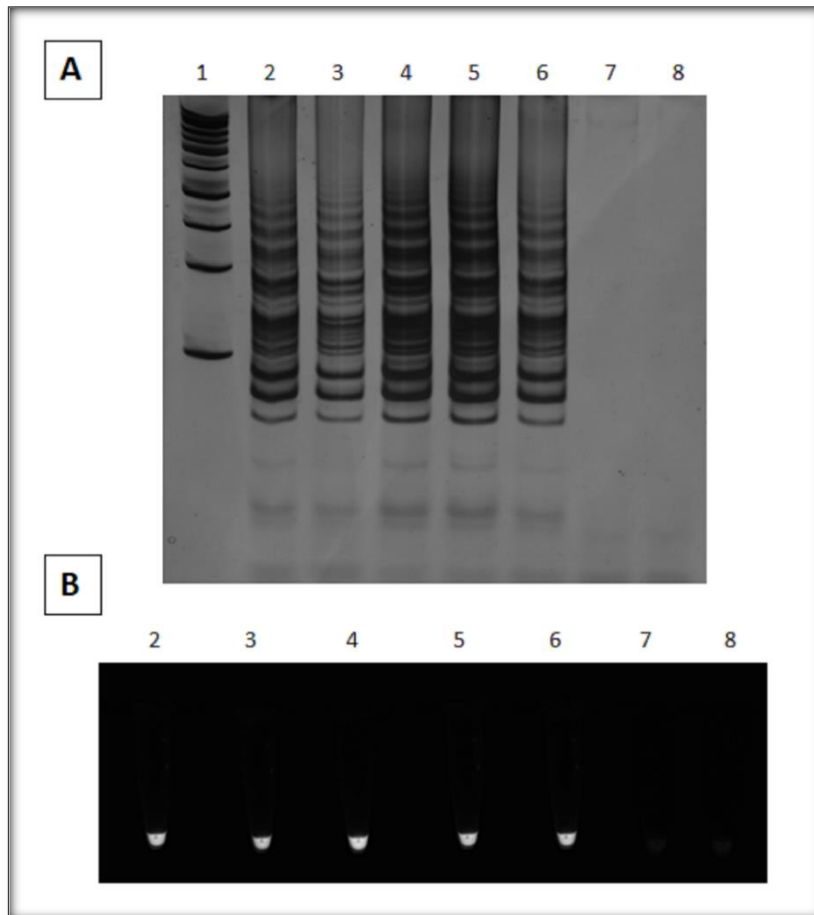
Foram testados três diferentes corantes para detecção colorimétrica: verde malaquita, azul de hidroxinaftol e SYBR® Safe. O corante verde malaquita foi testado nas concentrações 0,004% e 0,008% e o corante azul de hidroxinaftol 120µM. Não houve mudança de cor da reação quando os corantes foram adicionados antes ou depois da amplificação. No caso do verde malaquita permaneceu transparente e com o azul de hidroxinaftol, a cor violeta, o que indica amostras negativas. No gel de poliacrilamida também não foram observadas bandas, porém, no teste sem corante realizado em paralelo houve amplificação da amostra de interesse (*L. amazonensis*), indicando que estes corantes inibiram a reação. O corante SYBR® Safe foi adicionado na reação após a amplificação e testado nas diluições: 1:100, 1:20 e 1:10. Em todas as diluições observou-se amplificação da amostra de interesse com emissão da fluorescência e confirmação em gel de poliacrilamida, no entanto, a melhor diluição observada foi 1:20. Sendo então o SYBR® Safe o corante de escolha.

**c) Avaliação da reação de LAMP** – Após a padronização das melhores condições para a reação, foram realizados testes de especificidade e sensibilidade analítica. Para testar a especificidade, foram utilizadas amostras de DNA de diferentes espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani* e *L. guyanensis*) assim como de outros protozoários (*T. cruzi*, *B. canis* e *T. gondii*) e de diferentes cepas de *L. amazonensis* (BA276, Josefa, GV01 e GV02). A figura 6 mostra que a reação de LAMP realizada com os iniciadores de escolha “Lak” (mostrados na figura 5), foi específica para *L. amazonensis* quando comparada a outras espécies de *Leishmania* e de outros protozoários e a figura 7 mostra que a reação foi específica para as diferentes cepas de *L. amazonensis* testadas, com visualização tanto em géis de poliacrilamida 6% corados por prata, quanto por detecção colorimétrica utilizando SYBR® Safe com observação da fluorescência na amostra positiva.

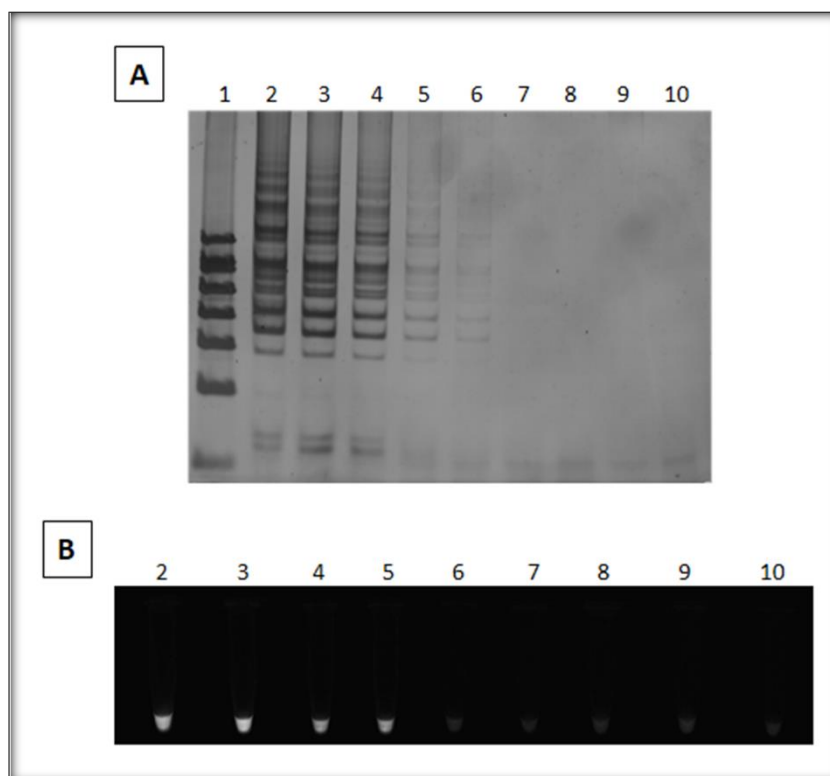
Para o teste de sensibilidade da reação, diferentes diluições (10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg) do DNA de *L. amazonensis* em mistura com 10ng do DNA de hamster não infectado foram utilizadas. O limite de detecção foi de até 10pg de DNA de *L. amazonensis* em gel de poliacrilamida 6% e de 100pg por detecção colorimétrica, como representado na figura 8.



**Figura 6:** Géis de poliacrilamida 6% corados por prata (A) e detecção colorimétrica utilizando SYBR® Safe (B) com o teste de especificidade da reação de LAMP com amostras de diferentes espécies de protozoários. 1 e 10 = padrão de peso molecular de 50 pares de bases; 2 = *L. amazonensis*; 3 = *L. infantum* (cepa BH401); 4 = *L. braziliensis*; 5 = *L. infantum* (cepa LPC-RPV); 6 = *L. major*; 7 = *L. mexicana*; 8 = *L. donovani*; 9 = *L. guyanensis*; 11 = *B. canis*; 12 = *T. cruzi*; 13 = *T. gondii*; 14 = controle negativo (DNA de hamster não infectado); 15 = controle mix (sem DNA).



**Figura 7:** Gel de poliacrilamida 6% corado por prata (A) e detecção colorimétrica utilizando SYBR® Safe (B) com a reação de LAMP utilizando diferentes cepas de *L. amazonensis*. 1= padrão de peso molecular de 1kb; 2= IFLA/BR/1967/PH8; 3= MHOM/BR/1989/BA276; 4= MHOM/BR/75/Josefa; 5= MCAN/BR/2012/GV01; 6= MCAN/BR/2012/GV02; 7= controle negativo (DNA de hamster não infectado); 8= controle mix (sem DNA).



**Figura 8:** Gel de poliacrilamida 6% corado por prata (A) e detecção colorimétrica utilizando SYBR® Safe (B) com o teste de sensibilidade da reação de LAMP com diferentes diluições do DNA de *L. amazonensis* em mistura com DNA de hamster não infectado. Diluições de 10ng até 100fg. 1=padrão de peso molecular de 50 pares de bases; 2= controle *L. amazonensis*; 3= 10ng; 4= 1ng; 5= 100pg; 6= 10pg; 7= 1pg; 8= 100fg; 9= controle negativo (DNA de hamster não infectado); 10= controle mix (sem DNA).

Após testar a especificidade e sensibilidade, foram feitas reações utilizando amostras de DNA de pele dos hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis* (n=9), *L. infantum* (n=9) e coinfeção (n=9). Foi realizada a PCR-RFLP das amostras acima em trabalho anterior (Celeste et al. 2017), sendo que, das nove amostras de pele de hamsters infectados com *L. amazonensis*, todas foram positivas na PCR convencional, e a espécie da infecção confirmada por RFLP. Das amostras de hamsters infectados com *L. infantum*, quatro de nove foram positivas na PCR, e confirmada na RFLP a infecção por essa espécie. No grupo de coinfeção, todas as nove amostras foram positivas na PCR, e todas apresentando o perfil de *L. amazonensis* na PCR-RFLP.

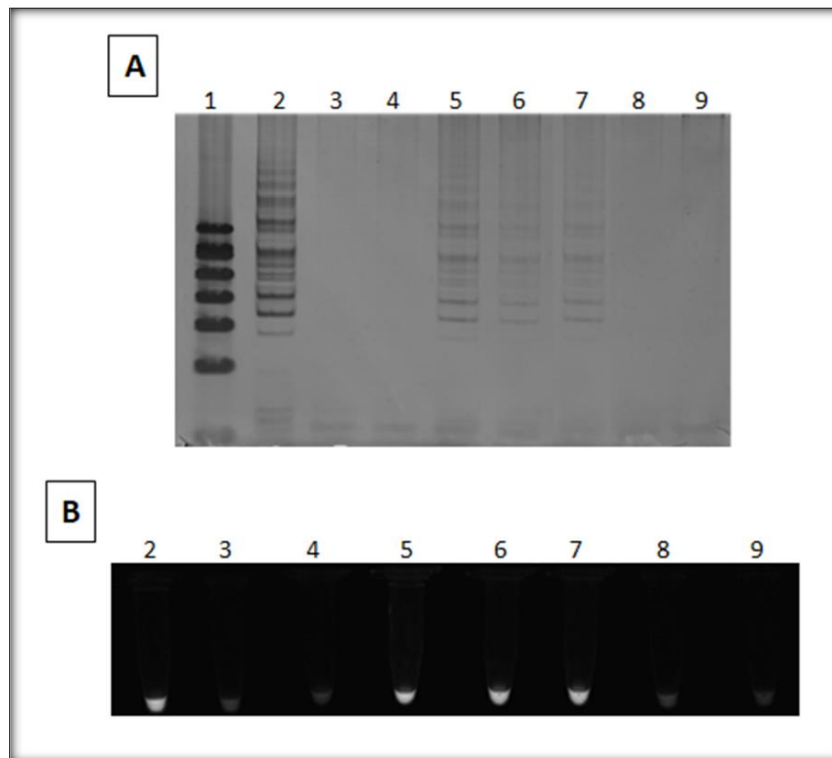
Com relação aos resultados da reação de LAMP utilizando as amostras de pele, oito de nove amostras de hamsters infectados com *L. amazonensis* foram positivas; das nove amostras

de pele com *L. infantum*, todas foram negativas; no grupo de animais coinfectados, das nove amostras, oito foram positivas na LAMP.

Todos esses resultados obtidos confirmam que a reação de LAMP foi 100% específica para *L. amazonensis* dentre as espécies testadas, e a sensibilidade de 89% quando comparada a PCR convencional. A tabela 4 mostra a relação de amostras positivas das diferentes infecções utilizando PCR e LAMP, e identificação da espécie por PCR-RFLP. A figura 9, com géis de poliacrilamida 6% representativos e detecção colorimétrica com SYBR® Safe, mostra os resultados da LAMP de três amostras de DNA de pele de animais infectados com *L. amazonensis*, sendo uma delas (canaleta 4) negativa, uma amostra com *L. infantum* e uma de coinfeção.

**Tabela 4:** Relação das amostras positivas na PCR e LAMP e identificação da espécie por PCR-RFLP nas amostras de pele de hamsters das diferentes infecções experimentais.

Espécie inoculada	Reação para diagnóstico					
	PCR		PCR-RFLP (espécie)	LAMP		
	N	%		N	%	
<i>L. amazonensis</i> (n=9)	9	100	<i>L. amazonensis</i> (n=9)	8	89	
<i>L. infantum</i> (n=9)	4	44,4	<i>L. infantum</i> (n=4)	0	0	
Coinfecção (n=9)	9	100	<i>L. amazonensis</i> (n=9)	8	89	



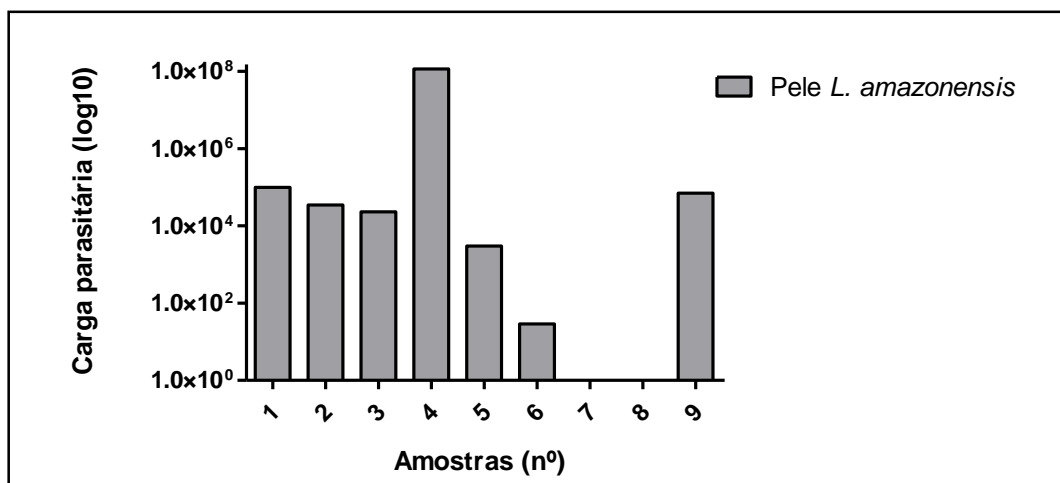
**Figura 9:** Géis de poliacrilamida 6% representativos (A) e detecção colorimétrica utilizando SYBR® Safe (B) com amostras de pele de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum* e coinfeção. 1= padrão de peso molecular de 50 pares de bases; 2= controle *L. amazonensis*; 3= controle *L. infantum*; 4 a 6 = pele *L. amazonensis*; 7 = pele coinfeção; 8 = pele *L. infantum*; 9 = controle negativo (DNA de hamster não infectado).

#### 4.2 PCR em tempo real (qPCR)

A qPCR foi realizada utilizando as amostras de DNA de pele dos hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis* (n=9). A figura 10 mostra o gráfico com a carga parasitária de cada uma das amostras, indicando que sete de nove, foram positivas.

Fazendo uma associação entre a carga parasitária na qPCR e os resultados da LAMP na infecção por *L. amazonensis* (tabela 5) observa-se que, das duas amostras negativas na qPCR (n°7 e n°8), apenas uma delas (n°7), foi negativa na LAMP, ou seja, a taxa de positividade na qPCR foi de 78%, sendo menos sensível do que a reação de LAMP (sensibilidade de 89%). Os resultados indicam também que, a técnica de LAMP foi capaz de amplificar uma amostra (n°6) com baixa carga parasitária ( $2,8 \times 10^1$ ).





**Figura 10:** Gráfico com a carga parasitária (log10) na qPCR das nove amostras de DNA de pele de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis* (amostras nº 1 a nº 9).

**Tabela 5:** Resultados da LAMP e qPCR das amostras de DNA de pele de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis*.

Amostras (nº)	LAMP	Carga parasitária (qPCR)
1	+	1x10 <sup>5</sup>
2	+	3,4x10 <sup>4</sup>
3	+	2,3x10 <sup>4</sup>
4	+	1x10 <sup>8</sup>
5	+	3x10 <sup>3</sup>
6	+	2,8x10 <sup>1</sup>
7	neg	neg
8	+	neg
9	+	7x10 <sup>4</sup>

(+) = amostra positiva; (neg) = amostra negativa.

## 4.3 Imunoproteômica

### 4.3.1 Padronização do Western blot (WB)

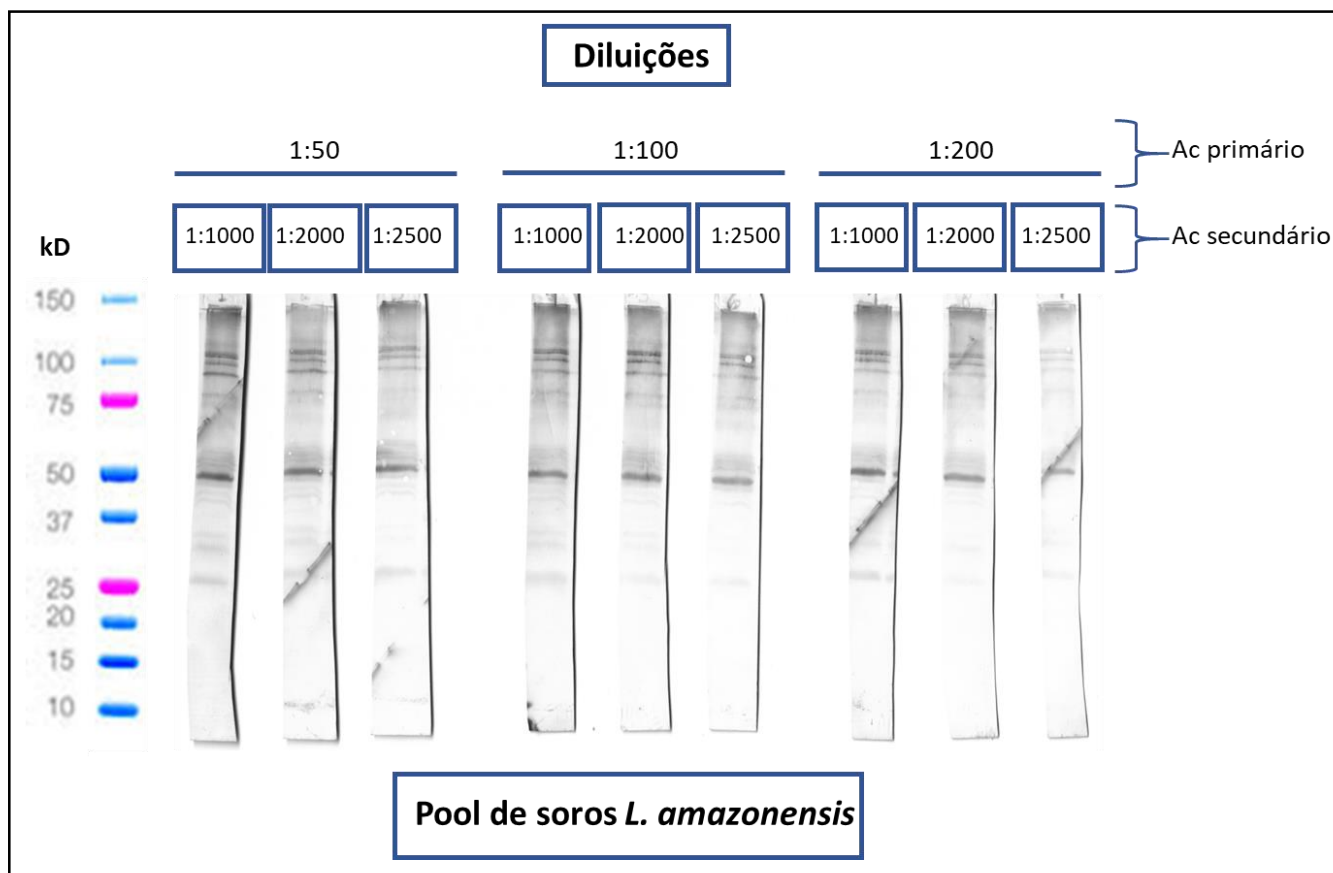
Para a padronização da técnica de WB, extratos proteicos (40µg/canaleta) de *L. amazonensis* foram fracionados em SDS-PAGE 12%, transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com diferentes diluições (1:50, 1:100 e 1:200) de anticorpo primário, que eram formados de *pools* de soros de hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum* e não infectado. Em seguida, foi feita a incubação com anticorpo secundário, que foi anti-IgG (1:1000, 1:2000 e 1:2500) de hamster conjugado com peroxidase e revelado por DAB e cloronaftol. Observou-se que as melhores diluições foram: anticorpo primário 1:100 e anticorpo secundário 1:2000, para todas as amostras. Nestas condições, observamos bandas bem definidas e menos *background*. As figuras 11 e 12, mostram as diferentes diluições de soros de hamsters infectados com *L. amazonensis* e *L. infantum* respectivamente e as diluições do anticorpo secundário testadas.

### 4.3.2 Seleção e identificação das proteínas antigênicas

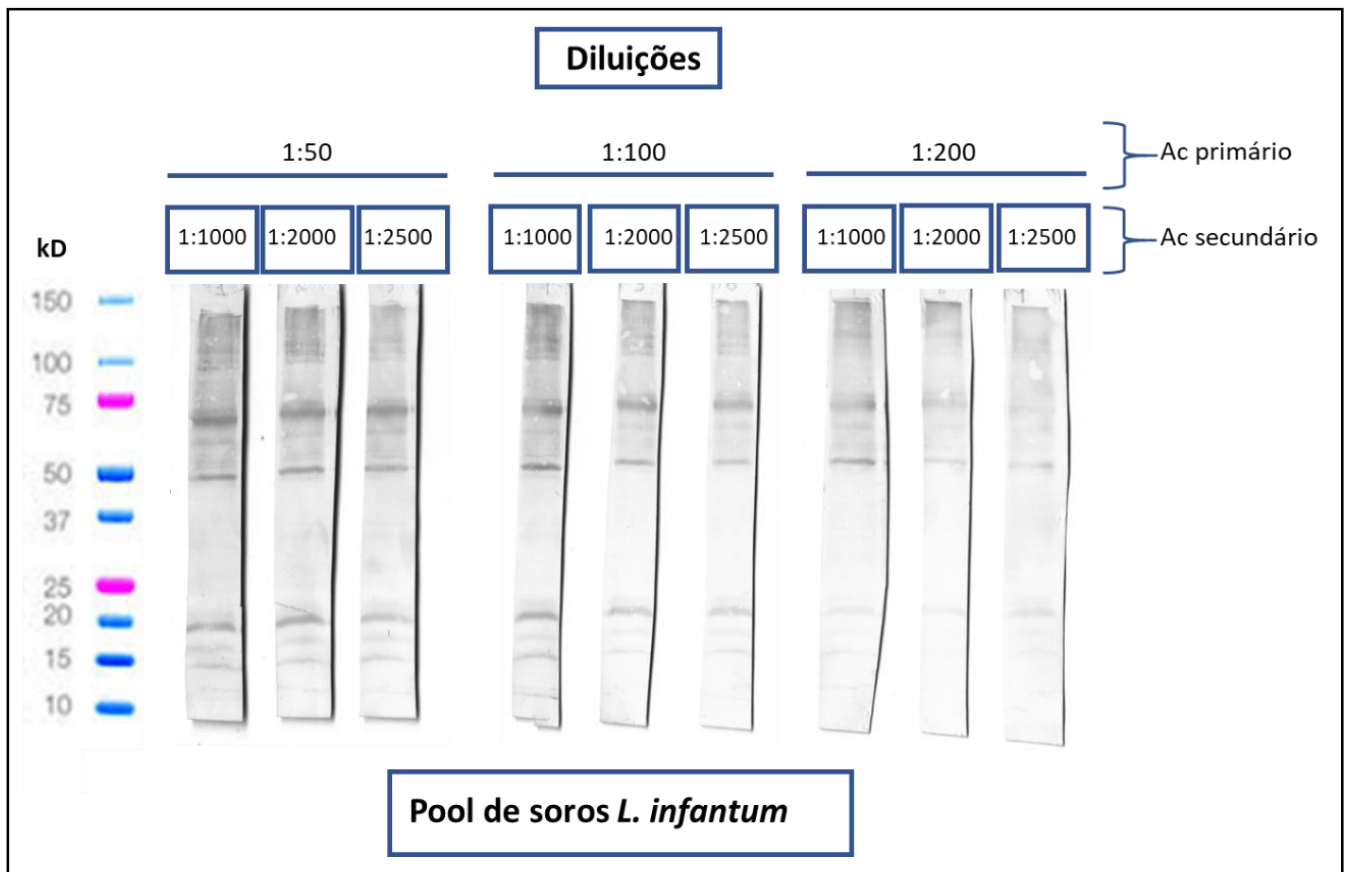
A seleção das proteínas antigênicas foi realizada em WB utilizando extrato proteico de *L. amazonensis* (150µg/*strips* 7cm e 800µg/*strips* 18cm) fracionado por eletroforese bidimensional (2-DE) e anticorpos nas diluições determinadas na padronização acima descrita. Os três experimentos independentes para cada *pool* de soros mostraram boa repetibilidade entre eles. Confirmada a repetibilidade com *strips* de 7cm, foram realizados WB com *strips* de 18cm.

Após a sobreposição das imagens dos géis 2-DE e das membranas de WB, os *spots* reativos a soros de animais infectados com *L. infantum* foram descartados e foi observado que não houve reatividade com soros de animais não infectados. Assim, um total de oito *spots* reativos especificamente ao *pool* de soros de hamsters infectados com *L. amazonensis* foram selecionados. Estes então, foram retirados do gel de 18cm e preparados para identificação por espectrometria de massas. A figura 13 mostra a localização no gel e na membrana dos *spots* que foram selecionados para identificação.

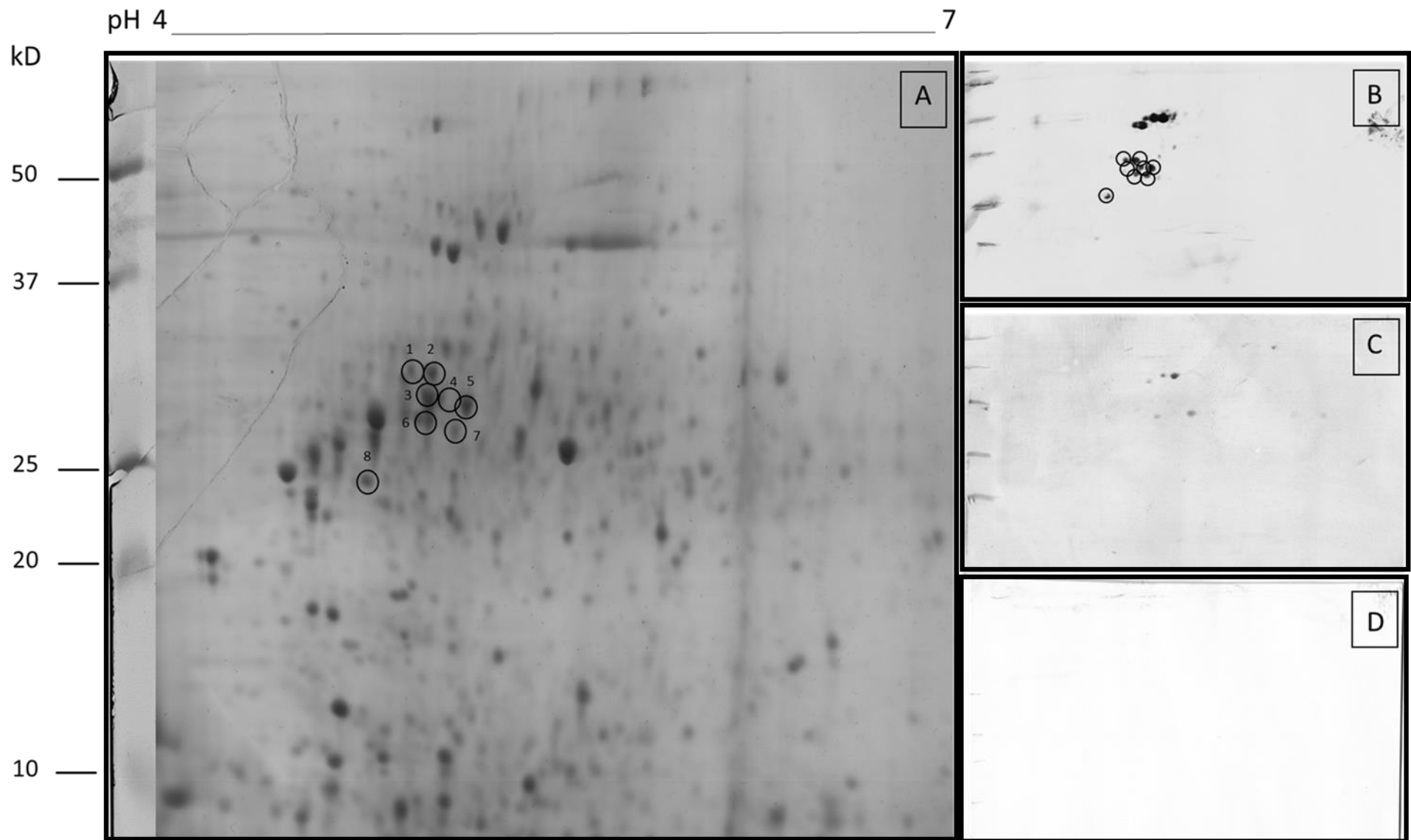
Dos oito *spots* selecionados, foi possível a identificação de seis por MALDI-ToF/ToF, que correspondem à duas proteínas antigênicas, sendo estas a  $\beta$ -tubulina e a HSP-70 (Proteína de Choque Térmico-70). Não foi possível a identificação dos *spots* 5 e 7. A tabela 6 mostra o número do *spot*, a proteína identificada, o número de acesso no UniProtKB, a massa molecular (MM) teórica e experimental aproximada e as sequências dos peptídeos.



**Figura 11:** Padronização do WB. Extrato proteico de *L. amazonensis* (40µg/canaleta) fracionados em SDS-PAGE 12% e transferido para membrana de nitrocelulose, incubada com diferentes diluições de *pool* de soros (1:50, 1:100 e 1:200) de hamsters infectados com *L. amazonensis* como anticorpo primário e de conjugado anti-IgG de hamster (1:1000, 1:2000 e 1:2500) como anticorpo secundário. Revelação com DAB,  $\alpha$ -4-cloronaftol e peróxido de hidrogênio.



**Figura 12:** Padronização do WB. Extrato proteico de *L. amazonensis* (40µg/canaleta) fracionados em SDS-PAGE 12% e transferido para membrana de nitrocelulose, incubada com diferentes diluições de *pool* de soros (1:50, 1:100 e 1:200) de hamsters infectados com *L. infantum* como anticorpo primário e de conjugado anti-IgG de hamster (1:1000, 1:2000 e 1:2500) como anticorpo secundário. Revelação com DAB,  $\alpha$ -4-cloronaftol e peróxido de hidrogênio.



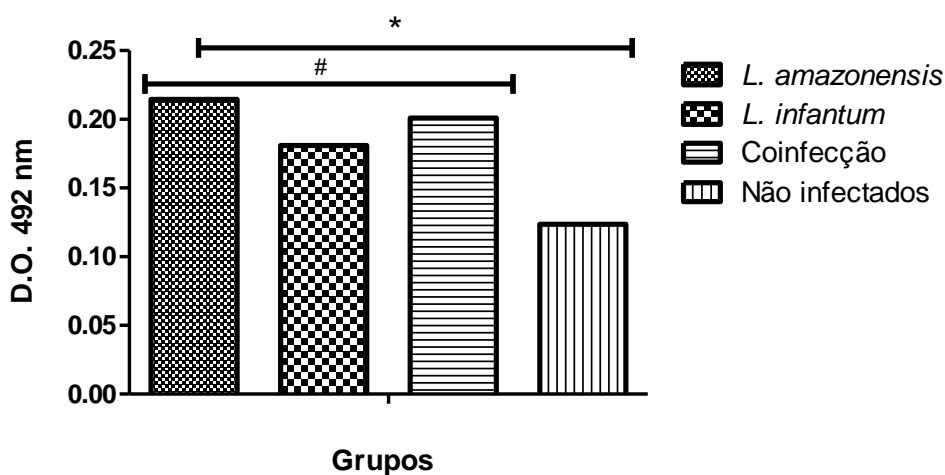
**Figura 13:** SDS-PAGE 12%, 2-DE com *strips* de 18 cm, pH 4-7, com 800 $\mu$ g de extrato proteico de *L. amazonensis*, corado por comassie G-250. Os *spots* de interesse estão circulos e numerados de 1 a 8 (A). Na figura B, C e D, estão as membranas do WB com extrato proteico de *L. amazonensis* incubadas com soro de hamsters infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum* e não infectado, respectivamente. Na membrana B com o soro homologo (infecoo por *L. amazonensis*), observa-se os mesmos *spots* selecionados no gel.

**Tabela 6:** Lista de proteínas antigênicas identificadas em cada um dos *spots* selecionados, número de acesso no UniProtKB, massa molecular (MM) teórica e experimental e as sequências dos peptídeos.

N° <i>spot</i>	Proteína	N° acesso	MM (kD)		Peptídeo
			Teórica	Exp.	
1	Tubulin beta chain	P21148	50,0	31	R.INVYFDESAGGR.Y
2	Heat shock 70 kDa protein	Q07437	71,2	31	K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G
	Tubulin beta chain	P21148	50,0	31	R.FPGQLNSDLR.K
3	Tubulin beta chain	P21148	50,0	30	R.FPGQLNSDLR.N
					R.INVYFDESAGGR.Y
					R.AVLMDLEPGTMDSVR.A
					K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K
4	Tubulin beta chain	P21148	50,0	30	R.INVYFDESAGGR.Y
6	Tubulin beta chain	P21148	50,0	28	R.INVYFDESAGGR.Y
8	Heat shock 70 kDa protein	Q07437	71,2	<25	K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G

#### 4.4 ELISA

A proteína recombinante utilizada como antígeno foi a HSP-70, identificada nos *spots* 2 e 8. Esse teste então foi realizado para avaliar a HSP-70 como um possível antígeno para diagnóstico específico para infecções por *L. amazonensis*. Dessa forma, testes iniciais utilizando o método de ELISA foram realizados com *pool* de soros de hamsters (n=9 em cada grupo) infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum*, coinfectados e não infectados. Os resultados indicam que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as absorvâncias dos grupos infectados quando comparados ao grupo de animais não infectados, porém, não houve diferença estatística significativa entre as absorvâncias dos grupos infectados (figura 14), indicando que a proteína utilizada não foi espécie-específica, mas foi capaz de diferenciar soros positivos dos negativos.



**Figura 14:** Gráfico com a absorvância no ELISA realizado utilizando *pool* de soros de hamsters (n=9 em cada grupo) experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, *L. infantum*, coinfectados e não infectados. A diferença estatística significativa está representada por \* ( $P < 0,05$ ) e # quando não houve diferença significativa.

## 5 Discussão

O desenvolvimento de um diagnóstico preciso e rápido para infecções por *Leishmania* é de grande importância, especialmente se a identificação de espécies for possível devido à implicação no prognóstico e dados epidemiológicos. No presente trabalho, padronizamos uma reação de LAMP utilizando um conjunto de iniciadores específicos para *L. amazonensis*. A reação mostrou 100% de especificidade com a visualização dos resultados usando gel de poliacrilamida e também por detecção colorimétrica usando o corante fluorescente SYBR® Safe. LAMP foi aplicado com sucesso como uma ferramenta útil no diagnóstico de infecções por *Leishmania* spp. (Takagi et al. 2009; Khan et al. 2012; Verma et al. 2013; Ghasemian et al. 2014; Gao et al. 2015; Kothalawala & Karunaweera 2016). No entanto, este é o primeiro trabalho no qual uma reação de LAMP específica para *L. amazonensis* foi padronizada. As principais vantagens do LAMP em relação à PCR convencional e qPCR são a alta sensibilidade e eficiência da amplificação, rapidez em que os ensaios podem ser concluídos, simplicidade e o equipamento de baixo custo necessário, além do monitoramento dos resultados com visualização a olho nu, através da turbidez ou uso de corantes intercalantes de DNA. Essas características tornam os ensaios de LAMP facilmente adaptáveis às condições de campo (Abbasi et al. 2016).

A padronização do uso de corantes para a visualização dos resultados da reação de LAMP foi realizada por diversos autores (Goto et al. 2009; Nzelu et al. 2014, 2016; Sriworarat et al. 2015; Verma et al. 2017; Mukhtar et al. 2018) sendo um diferencial do método, trazendo uma maior rapidez na obtenção do resultado, assim como uma maior facilidade de realização no campo e na rotina clínica. SYBR® Green I é um corante bastante utilizado, no entanto, não pode ser adicionado antes da reação, pois este inibe a amplificação do DNA, assim, um corante fluorescente é frequentemente adicionado após a reação ter ocorrido (Tao et al. 2011). Em nosso trabalho, foi possível padronizarmos uma forma de visualização do resultado utilizando o corante fluorescente intercalante de DNA SYBR® Safe. A diferenciação de amostras positivas das negativas foi observada de forma nítida com a utilização do equipamento Image Quant™ LAS 500, sendo isso de grande importância, já que alguns corantes que são utilizados, assim como a análise da turbidez, em alguns casos não permitem uma diferenciação tão clara dos resultados, gerando dúvidas e sendo necessário o uso de géis para confirmação. Não foi possível a padronização com corantes que não necessitam de equipamentos para visualização dos resultados (verde malaquita e azul de hidroxinaftol), isso com certeza facilitaria o uso da técnica na rotina e no campo. O fato de utilizarmos um corante que é adicionado após a amplificação



não foi um problema na execução da técnica devido às contaminações, e atribuímos a isso o cuidado nas manipulações dos materiais e reagentes durante todas as etapas, diferentes ambientes para preparação do mix, adição do DNA e do corante, sendo utilizado sempre controles negativos para o monitoramento de possíveis contaminações.

O conjunto de iniciadores selecionados tem como alvo a sequência do minicírculo do kDNA de *L. amazonensis* (GenBank: U19810.1). Esta região do kDNA de *Leishmania* tem sido usada por vários autores como um alvo para o desenho de iniciadores em reações espécies-específicas para *L. donovani* (Takagi et al. 2009; Khan et al. 2012; Verma et al. 2013; Kothalawala & Karunaweera 2016) e *L. infantum* (Ghasemian et al. 2014; Gao et al. 2015). O kDNA compreende dois componentes: o maxicírculo e o minicírculo. Os minicírculos são pequenas moléculas circulares com cerca de 800 pb, contendo uma região conservada de 120 nucleotídeos e uma região altamente variável que codifica os RNAs guia envolvidos na edição de genes maxicirculares (Aphasizhev e Aphasizhev 2011). Estes têm um alto número de cópias (10.000 cópias por parasito), resultando em alta sensibilidade em testes diagnósticos baseados neste alvo. No entanto, minicírculos dentro de uma cepa não são todos idênticos e podem ser divididos em classes de minicírculos (Singh et al. 1999). Minicírculos permitem o desenho de iniciadores específicos para o gênero, subgênero ou uma espécie (Conter et al. 2018).

A técnica de LAMP foi descrita inicialmente utilizando dois pares de iniciadores (interno e externo) sendo específicos para seis regiões distintas da sequência alvo (Notomi et al. 2000), e no processo de aprimoramento, um par de iniciadores, chamados de *Loop primers* (LpF e LpB) foram criados, estes aceleram a reação, pois formam novos sítios para amplificação do DNA, proporcionando maior especificidade (Nagamine et al. 2002). No presente trabalho, utilizamos os seis iniciadores que amplificaram diferentes cepas de *L. amazonensis* isoladas de flebotomíneos (PH8), de pacientes (Josefa e BA276) e de cães (GV01 e GV02). Além disso, estes foram desenhados a partir da região variável do minicírculo do kDNA, o que permite a diferenciação de espécies, sendo espécie-específico.

O limite de detecção da reação foi de 10 pg de DNA usando gel de poliacrilamida para visualizar o resultado e 100 pg por detecção colorimétrica com SYBR® Safe. Em estudos anteriores testando o limite de detecção de DNA de *Leishmania* usando a região do kDNA como alvo para a reação de LAMP, 1fg foi a menor concentração observada (Takagi et al. 2009; Khan et al. 2012; Verma et al. 2013; Gao et al. 2015). Foi observado que há considerável variação entre as diferentes espécies e entre iniciadores para uma mesma espécie, variando de 1fg a 100pg (Karani et al. 2013, Verma et al. 2017). Estes estudos indicam que há uma grande variação no limite de detecção do DNA de *Leishmania* usando LAMP, que pode estar

relacionado com iniciadores e região alvo, com as espécies de *Leishmania* utilizadas e o método de visualização dos resultados. Em nosso trabalho, realizamos o teste de sensibilidade com amostras de DNA de *L. amazonensis* em mistura com DNA genômico de hamster para tentarmos mimetizar uma infecção natural.

O ensaio de LAMP aqui desenvolvido mostrou 100% de especificidade e 89% de sensibilidade quando comparado com a PCR convencional e foi mais sensível que a qPCR (com uma sensibilidade de 78%). Resultados semelhantes foram observados por outros autores, onde LAMP para infecção experimental teve um limite de detecção de  $10^3$  parasitos/ml sendo mais sensível que a qPCR, com limite de detecção de  $10^4$  parasitos/ml (Sriworarat et al. 2015). Da mesma forma, em amostras de sangue, LAMP demonstrou uma sensibilidade maior do que a qPCR (Abbasi et al. 2016). Além disso, quando o Loopamp™ *Leishmania* Detection Kit foi usado com diluição seriada ( $10^3$  a  $10^{-7}$ ) do DNA de *L. infantum*, LAMP apresentou maior sensibilidade (detectando  $10^{-3}$  parasitos/ $\mu$ l) do que PCR *nested* e qPCR, cujo limite de detecção foi  $10^{-2}$  parasitos/ $\mu$ L (Ibarra-Meneses et al. 2018). A reação de LAMP desenvolvida foi capaz de amplificar uma amostra positiva na qPCR com uma carga parasitária de apenas 28 parasitos em 50ng de DNA. Foi previamente demonstrado que a reação de LAMP pode amplificar amostras com baixa carga parasitária (Ghasemian et al. 2014, Abbasi et al. 2016).

O diagnóstico de leishmaniose por técnicas moleculares sensíveis foi introduzido há mais de 20 anos. No entanto, estas técnicas moleculares não são amplamente utilizadas devido à sua complexidade. Com o advento do LAMP, as técnicas moleculares podem agora ser perfeitamente integradas aos diagnósticos de campo (Sriworarat et al. 2015). O ensaio de LAMP desenvolvido no presente estudo foi capaz de detectar DNA exclusivamente de *L. amazonensis* quando comparado a espécies de outros protozoários e mesmo a outras espécies de *Leishmania*. A identificação de espécies de *Leishmania* é importante para determinar a distribuição geográfica das espécies e detectar casos alóctones que já foram relatados. A leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis* foi relatada em uma região onde apenas casos em que o agente etiológico previamente encontrado foi *L. braziliensis* causando a forma cutânea da doença (Dorval et al. 2006). Além disso, a leishmaniose visceral canina causada por *L. amazonensis* foi relatada em regiões onde apenas casos de infecção por *L. infantum* haviam sido previamente relatados (Tolezano et al. 2007; Dias et al. 2011; Hoffmann et al. 2012 Sanches et al. 2016; Valdivia et al. 2017; Souza et al. 2019), sugerindo o estabelecimento dessa espécie em áreas urbanas. Na LV causada por *L. infantum*, os cães são os principais reservatórios, mas esses animais têm um papel desconhecido na epidemiologia da doença quando infectados por *L. amazonensis*. Infelizmente, a identificação das espécies de *Leishmania* não é realizada

rotineiramente devido às dificuldades dos métodos disponíveis. Assim, a possibilidade de usar LAMP para identificação de espécies pode ser promissora.

Utilizando abordagem imunoproteômica com identificação das proteínas por espectrometria de massas, um total de 8 *spots* que reagiram exclusivamente a soros de hamsters infectados com *L. amazonensis* foram selecionados. Foi possível a identificação de 6 desses *spots*, correspondendo a duas proteínas, sendo estas a HSP-70 e a  $\beta$ -tubulina. Esse número maior de *spots* em relação ao número de proteínas identificadas se deve ao fato de que ambas foram encontradas repetidamente em diferentes *spots*, o que pode ocorrer, por exemplo, quando há prováveis isoformas destas proteínas ou uma possível clivagem durante o processamento das amostras, ou ainda, devido às modificações pós-traducionais adicionadas às cadeias polipeptídicas. Essas situações podem alterar a massa molecular e o ponto isoelétrico das proteínas, conseqüentemente, alterando a posição do *spot* no gel.

A HSP-70 é uma proteína que desempenha um papel fundamental tanto em resposta ao choque térmico ou outro estresse, quanto em células em estado nativo. Está envolvida com os processos de enovelamento, montagem, secreção, ativação e degradação, além de interagir com vários componentes de vias de sinalização que regulam o crescimento e o desenvolvimento celular. Folgueira et al. (2008) demonstraram que a ausência de HSP-70, tem um efeito pleiotrópico, influenciando na morfologia celular, diminuição da replicação e da virulência de *L. infantum*. Em um trabalho anterior do nosso grupo (Fialho Jr 2017), a proteína HSP-70 apresentou um aumento significativo de abundância em amastigotas esplênicas na cepa BH400 de *L. infantum*, e diminuída em promastigotas, corroborando a importância exercida por ela referente à visceralização e conseqüentemente, sobrevivência do parasito em um ambiente hostil.

Essas duas proteínas identificadas em nosso trabalho, também foram encontradas em um trabalho anterior do nosso grupo (Lima et al. 2016) como sendo as mais redundantes e imunorreativas em três espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*) frente a soros de cães com LV. Além disso, a proteína HSP-70 recombinante tem sido utilizada em diagnóstico sorológico para as formas cutânea e mucocutânea da LT (Skeiky et al. 1995; Zurita et al. 2003; Souza et al. 2013), confirmando ser antigênica em diversas espécies do parasito e formas clínicas. Devido a essa antigenicidade em diferentes espécies de *Leishmania* explica-se o fato de que a proteína HSP-70 recombinante não foi uma boa candidata a antígeno específico no ELISA para infecções por *L. amazonensis*, sendo necessários estudos mais aprofundados e testes utilizando, por exemplo, diferentes fragmentos ou peptídeos desta proteína.

O uso de peptídeos têm mostrado ótimos resultados para o diagnóstico sorológico utilizando ELISA para cães com LV (Faria et al. 2011); em pacientes com LT, LV e cães com LV utilizando peptídeos da proteína HSP83.1 da espécie *L. braziliensis* (Menezes-Souza et al. 2014) e para infecções por *T. cruzi*, sendo específicos para diferentes cepas do parasito (Mendes et al. 2013).

Vale destacar que os *spots* foram selecionados por serem reativos somente frente a soros com infecção por *L. amazonensis* e foi surpreendente a identificação de proteínas que são conhecidas por sua antigenicidade não-específica, como a  $\beta$ -tubulina e HSP-70. Todavia, devido a localização no gel 2-DE, pode-se perceber que não se tratava dessas proteínas em sua forma nativa, pois essas proteínas apresentam massa molecular (MM) e ponto isoelétricos (PI) preditos bem diferentes do observado em nossos géis. A  $\beta$ -tubulina tem MM predita de 50kDa enquanto a HSP-70 tem MM de 71,2 kDa e todos os *spots* selecionados apresentavam MM entre 25 e 35 kDa, confirmado a possibilidade que uma região de cada uma dessas proteínas possa ainda ser promissora para diagnóstico específico.

Zurita et al. (2003) isolaram e caracterizaram o gene que codifica a HSP-70 na espécie *L. braziliensis*, analisaram a antigenicidade da proteína recombinante e realizaram mapeamento para localizar as regiões contendo os principais epitopos antigênicos. A proteína foi dividida em 5 fragmentos sobrepostos e realizada as construções recombinantes correspondentes. Os resultados mostraram que o fragmento recombinante carboxi-terminal pode ser utilizado como um antígeno no diagnóstico específico de LC e MC causado por *L. braziliensis*, pois não apresenta reação cruzada com os soros de pacientes chagásicos, apresentando 70% de sensibilidade. Já o uso da HSP-70 recombinante não pode ser utilizado como marcador específico da doença por causa da reação cruzada com soros de pacientes chagásicos crônicos. Porém, não foram testados soros de pacientes com LV para observação de reação cruzada, com isso, o teste proposto não pode ser considerado específico para LT.

A proteína  $\beta$ -tubulina recombinante também já foi utilizada como candidata a antígeno para o diagnóstico da LT, apresentando 100% de sensibilidade e 82,5% de especificidade (Duarte et al. 2015); e em outro estudo, esta proteína apresentou 100% de sensibilidade e 97,78% de especificidade (Lima et al. 2018). Ambos testaram reação cruzada com pacientes chagásicos, porém, não testaram se existe reação cruzada com pacientes com LV. E nos dois trabalhos, a proteína  $\beta$ -tubulina apresentou maior sensibilidade e especificidade do que quando usado antígeno bruto de *L. braziliensis*.

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, a reação de LAMP específica para *L. amazonensis* e as inúmeras vantagens do método (rápido, eficiente, altamente sensível

e específico), acreditamos que este possa ser utilizado como uma ferramenta diagnóstica promissora na prática clínica, estudos de campo e pesquisa. Em relação ao método sorológico, são necessários estudos mais aprofundados das proteínas identificadas (HSP-70 e  $\beta$ -tubulina) em busca de regiões dessas proteínas que possam constituir antígeno específico para diagnóstico das infecções por *L. amazonensis*.

## 6 Conclusões

- Foi possível padronizar um teste molecular específico para infecções por *L. amazonensis* utilizando LAMP, com a visualização dos resultados utilizando gel de poliacrilamida e detecção colorimétrica;
- A LAMP aqui padronizada foi eficaz tanto em amostras de DNA extraídas de cultura, quanto de pele dos animais infectados, com especificidade de 100% e sensibilidade de 89%, tendo também sido mais sensível que a PCR em tempo real;
- Em WB a partir de gel 2-DE e soros de animais experimentalmente infectados, foram selecionados 8 *spots* reativos exclusivamente a soros de animais infectados com *L. amazonensis* e não reativos a soros de infectados com *L. infantum* ou não infectados. Nesses *spots* foram identificadas as proteínas (HSP-70 e  $\beta$ -tubulina) como antígenos candidatos para diagnóstico sorológico espécie-específico;
- A proteína HSP-70 recombinante como antígeno em ELISA, apesar de diferenciar infectados de não infectados, não foi específica para diagnóstico da infecção por *L. amazonensis*.

Os dados gerados até o momento foram suficientes para um pedido de patente e redação de um artigo científico:

“Iniciadores, kit e método molecular para diagnóstico de leishmaniose tegumentar, e usos” (BR 10 2019 005228 7) (anexo).

“Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania amazonensis* in skin samples” (submetido – *Experimental Parasitology*) (anexo).

## 7 Referências bibliográficas

- Abbasi I, Kirstein OD, Hailu A, Warburg A 2016. Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of *Leishmania* DNA in human blood samples. *Acta Trop* 162: 20-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.009>.
- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, Gonçalves da Costa SC 2004. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121: 179-187.
- Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, Safi SE, Schallig HD 2010. Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of *Leishmania* Parasites in Clinical Samples. *Am J Trop Med Hyg* 82(4): 591-596. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0369.
- Adams ER, Schoone GJ, Versteeg I, Gomez MA, Diro E, Mori Y, Perlee D, Downing T, Saravia N, Assaye A, Hailu A, Albertini A, Ndung'u JM, Schallig H 2018. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00386-18>.
- al-Diwany LJ, al-Awkati NA, Atia M, Rassam MB 1995. Concomitant natural infection with *L. donovani* and *L. major*: a case report from Iraq. *Soz Praventivmed* 40: 234–238.
- Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AM, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SM 2006. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100(1): 79-82. DOI: 10.1016/j.trstmh.2005.06.025.
- Almeida MC, Cuba-Cuba CA, Moraes MA, Miles MA 1996. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol* 115:311-316.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1-88.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
- Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ 2006. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 140: 231-238.
- Antoniou M, Doulgerakis C, Pratlong F, Dedet JP, Tselentis Y 2004. Short report: treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg* 71(1): 71–72.
- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281.

- Babiker AM, Ravagnan S, Fusaro A, Hassan MM, Bakheit SM, Mukhtar MM, Cattoli G, Capeli G 2014. Concomitant Infection with *Leishmania donovani* and *L. major* in Single Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Patients from Sudan. *J Trop Med*. doi: 10.1155/2014/170859.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F 2007. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 64: 1-109.
- Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, Araújo HS, Dias ED, Pinheiro AC 2013. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. *Biomed Res Int*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/405083>.
- Barral A, Badaró R, Barral-Netto M, Grimaldi JG, Momen H, Carvalho EM 1986. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of american visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 35: 732–734.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi JG, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546.
- Berman JD 2005. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* 7:33-38.
- Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 828–831. doi:0.1128/CDLI.8.4.828–831.2001.
- Britto C, Pirmez C, Fernandes O 2005. Técnicas básicas de diagnóstico molecular em doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura JR editor. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 195-23.
- Bruna-Romero O, Hafalla CR, González-Aseguinolaza G, Sano GI, Tsuji M, Zavala F 2001. Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single Anopheles mosquito using a highly sensitive real-time PCR. *Int J Parasitol* 31: 1499–1502.
- Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(2): 775-9.
- Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R 2003. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68(3): 321-4.
- Cataldo JI, de Queiroz Mello FC, Mouta-Confort E, de Fátima Madeira M, de Oliveira Schubach A 2010. Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Clin Lab Anal* 24: 289–294. doi:10.1002/jcla.20402.



- Celeste JL, Moura AV, França-Silva JC, Sousa GM, Silva SO, Melo MN, Tafuri WL, Souza CC, Andrade HM 2017. Experimental mixed infection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology*. doi:10.1017/S0031182017000464.
- Chaouch M, Mhadhbi M, Adams E, Schoone GJ, Limam S, Gharbi Z, Darghouth MA, Guizani I, BenAbderrazak S 2013. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania infantum* in canine leishmaniasis based on cysteine protease B genes. *Vet Parasitol*. doi 10.1016/j.vetpar.2013.07.038.
- Choi CM, Lerner EA 2001. Leishmaniasis as an Emerging Infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6(3): 175-82.
- Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas LM, Pires SF, Chapeaurouge AD, Perales J, Ferreira AT, Giusta MS, Melo MN, Gazzinelli RT 2011. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. *J Proteome Res* 10: 2172–2184.
- Cupolillo E 2005. Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. [acessado em dezembro de 2017] [http://www.panaftosa.org.br/Comp/Zoonoses/Leishma/doc/Inf\\_final\\_leish\\_005.pdf](http://www.panaftosa.org.br/Comp/Zoonoses/Leishma/doc/Inf_final_leish_005.pdf).
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S, Bolás-Fernández F 2006. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics* 6: 4187–4194.
- den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J 2011. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect* 17(10):1471-7.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- de Souza CSF, Calabrese KS, Abreu-Silva AL, Carvalho LOP, Cardoso FO, Dorval MEMC, Oshiro ET, Quaresma PF, Gontijo CMF, Pacheco RS, Rossi MID, da Costa SCG, Zaverucha do Valle T. *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. *Histol Histopathol* 33(7): 705-716. doi: 10.14670/HH-11-965.
- Dias ES, Regina-Silva S, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araújo SC, Valadão JL, Lara-Silva FO, Oliveira FS, Pacheco RS, Fortes-Dias CL 2011. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban área of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 176: 101-111. doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.014.
- Dorval MEMC, Oshiro ET, Cupolillo E, Castro ACC, Alves TP 2006. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 43–46. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000100008>.

- Duarte MC, Pimenta DC, Menezes-Souza D, Magalhães RDM, Diniz JLCP, Costa LE, Chávez-Fumagalli MA, Lage PS, Bartholomeu DC, Alves MJM, Fernandes AP, Soto M, Tavares CAP, Gonçalves DU, Rocha MOC, Coelho EAF 2015. Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 22:1187–1196. doi:10.1128/CVI.00465-15.
- Dujardin JC 2006. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol* 22: 4-6.
- Ejazi SA, Bhattacharyya A, Choudhury ST, Ghosh S, Sabur A, Pandey K, Das VNR, Das P, Rahaman M, Goswami RP, Ali N 2018. Immunoproteomic Identification and Characterization of *Leishmania* Membrane Proteins as Non-Invasive Diagnostic Candidates for Clinical Visceral Leishmaniasis. *Sci Rep* 8(1):12110.
- Faria AR, Costa MM, Giusta MS, Grimaldi Jr. G, Penido MLO, Gazzinelli RT, Andrade HM 2011. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. doi:10.1371/journal.pntd.0001310.
- Faria AR, Pires SF, Reis AB, Coura-Vital W, da Silveira JAG, Sousa GM, Bueno MLC, Gazzinelli RT, Andrade HM 2017. Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR. *Vet Parasitol*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.020>.
- Faria AR, Veloso LC, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT, Andrade HM 2015. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum* Infected Dogs. *PLoS Negl Trop Dis*. doi:10.1371/journal.pntd.0003429.
- Fialho Jr LC 2017. Proteoma Quantitativo para Identificação de Potenciais Fatores de Virulência em *Leishmania infantum*, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 166 pp.
- Folgueira C, Carrión J, Moreno J, Saugar JM, Cañavate C, Requena JM (2008). Effects of the disruption of the HSP70-II gene on the growth, morphology, and virulence of *Leishmania infantum* promastigotes. *Int Microbiol* 11: 81-89. doi: 10.2436/20.1501.01.47.
- Forgher M, Basu R, Roychoudhury K, Theinert S, Roy S, Sundar S, Walden P 2006. Mapping the Antigenicity of the Parasites in *Leishmania donovani* Infection by Proteome Serology. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000040>.
- Gao C, Ding D, Wang J, Steverding D, Wang X, Yang Y, Shi F 2015. Development of a LAMP assay for detection of *Leishmania infantum* infection in dogs using conjunctival swab samples. *Parasit Vectors*. doi 10.1186/s13071-015-0991-2.
- Ghasemian M, Gharavi MJ, Akhlaghi L, Mohebbali M, Meamar AR, Aryan E, Oormazdi H 2014. Development and Assessment of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Iran. *Irian J Parasitol* 9(1): 50-59.

- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, da-Cruz AM 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771–779.
- Goto H, Lindoso JA 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8(4):419–33. doi:10.1586/eri.10.19.
- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki KI 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Short Technical Reports* 46(3): 167-172.
- Gramiccia M, Gradoni L 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35: 1169-1180.
- Hoffmann AR, Navarro IT, Camargo VE, Caldart ET, Breganó RM, Pereira PM 2012. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil – relato de caso. *Semina: Ciências Agrárias* 33(2): 3265-3270. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33Supl2p3265.
- Ibrahim ME, Smyth AJ, Ali MH, Barker DC, Kharazmi A 1994. The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites. *Acta Trop* 57: 327–332.
- Ikononopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG 2003. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. *Vet Parasitol* 113: 99-113.
- Imai K, Tarumoto N, Amo K, Takahashi M, Sakamoto N, Kosaka A, Kato Y, Mikita K, Sakai J, Murakami T, Suzuki Y, Maesaki S, Maeda T 2017. Non-invasive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by the direct boil loop-mediated isothermal amplification method and MinION™ nanopore sequencing. *Parasitol Int.* doi 10.1016/j.parint.2017.03.001.
- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods* 70(3): 499-501.
- Khan MG, Bhaskar KR, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D 2012. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasit Vectors* 2:280.
- Kobets T, Havelková H, Grekov I, Volkova V, Vojtísková J, Slapnicková M, Kurey I, Sohrabi Y, Svobodová M, Demant P, Lipoldová M 2012 Genetics of host response to *Leishmania tropica* in mice – different control of skin pathology, chemokine reaction, and invasion into spleen and liver. *PLoS Negl Trop Dis* 6(6): e1667. doi:10.1371/journal.pntd.0001667.

- Kothalawala HS, Karunaweera ND 2016. Loop-mediated isothermal amplification assay as a sensitive diagnostic tool for *Leishmania donovani* infections in Sri Lanka. *Ceylon Medical Journal* 61: 68-70. <http://doi.org/10.4038/cmj.v61i2.8286>.
- Kumar S, Kumar D, Chakravarty J, Rai M, Sundar S 2012. Identification and characterization of a novel *Leishmania donovani* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 86:601–605. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0261>.
- Lainson R, Shaw JJ 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 22; 273: 595-600.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1. Academic Press, London, p. 1-120.
- Leite HM 2019. Elisa Quimioluminescente com Proteínas Recombinantes para o Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 48pp.
- Lima BS, Fialho Jr LC, Pires SF, Tafuri WL, Andrade HM 2016. Immunoproteomic and bioinformatic approaches to identify secreted *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum* proteins with specific reactivity using canine serum. *Vet Parasitol* 223: 115-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.019>.
- Lima BSS, Pires SF, Fialho LC, Oliveira EJ, Machado-de-Ávila RA, Chávez-Olórtegui C, Chapeaurouge AD, Perales J, Andrade HM 2017. A Proteomic Road To Acquire An Accurate Serological Diagnosis For Human Tegumentary Leishmaniasis. *Journal of Proteomics* 151: 174-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.05.017>.
- Lima MP, Costa LE, Lage DP, Dias DS, Ribeiro PA, Machado AS, Ramos F, Salles BC, Fagundes Mi, Carvalho GB, Franklin ML, Chávez-Fumagalli MA, Machado-de-Ávila RA, Menezes-Souza D, Duarte MC, Teixeira AL, Gonçalves DU, Coelho EA 2018. Diagnostic application of recombinant *Leishmania* proteins and evaluation of their in vitro immunogenicity after stimulation of immune cells collected from tegumentary leishmaniasis patients and healthy individuals. *Cell Immunol* 334: 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.09.006>.
- Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Leal CA, Melo C, Confort EM, Marzochi 2006. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 138: 366–370.
- Madeira MF, Schubach A, Schubach TPM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MCA 2005. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:442-445.

- Mahmoudzadeh-Niknam H, Kiaei SS, Irvani D 2007. Viscerotropic growth pattern of *Leishmania tropica* in BALB/c mice is suggestive of a murine model for human viscerotropic leishmaniasis. *Korean J Parasitol* 45(4): 247-253.
- Maia C, Campino L 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158: 274-287.
- Manna L, Paciello O, Morte R, Gravino A 2012. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasit Vectors* 5:216.
- Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, Silva RA, Oliveira ME, Borges EC, Sanguinette CC, Melo MN 2010. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J. Med. Entomol.* 47: 1212–1219.
- Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls AL, Le Pont F 2002. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous Leishmaniasis in Bolivia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 96: 529–532.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF 1994. Leishmanioses tegumentar e visceral no Brasil - Antropozoonoses emergentes e perspectivas de controle. *Cad Saúde Pública* 10(2): 359-75.
- Mebrahtu YB, Lawyer PG, Hendricks LD, Muigai R, Oster CN, Perkins PV, Koech DK, Pamba H, Roberts CR 1991. Concurrent infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania major* in a Kenyan patient: Clinical description and parasite characterization. *Am J Trop Med Hyg* 45:290-296.
- Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA 1999. Histological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 17: 297-304.
- Meireles CB, Maia LC, Soares GC, Teodoro IPP, Gadelha MDSV, da Silva CGL, de Lima MAP 2017. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Acta Trop* 172:240–254.
- Mendes TAO, Reis Cunha JL, de Almeida Lourdes R, Rodrigues Luiz GF, Lemos LD, Santos AR, da Câmara AC, Galvão LM, Bern C, Gilman RH, Fujiwara RT, Gazzinelli RT, Bartholomeu DC 2013. Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays. *PLoS Negl Trop Dis* 7(10): e2524. doi:10.1371/journal.pntd.0002524.
- Menezes-Souza D, Mendes TAO, Gomes MS, Bartholomeu DC, Fujiwara RT 2015. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1): e3426. doi:10.1371/journal.pntd.0003426.
- Menezes-Souza D, Mendes TAO, Gomes MS, Reis-Cunha JL, Nagem RA, Carneiro CM, Coelho EA, Galvão LM, Fujiwara RT, Bartholomeu DC 2014. Epitope Mapping of the HSP83.1 Protein of *Leishmania braziliensis* Discloses Novel Targets for Immunodiagnosis of Tegumentary and Visceral Clinical Forms of Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 21(7): 949-959.

- Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL 2014. ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect Infect Dis* doi: 10.1155/2014/607287.
- Mori Y, Notomi T 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 15:62-69.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T 2001. Detection of Loop mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 150–154. doi:10.1006/bbrc.2001.5921.
- Mukhtar M, Ali SS, Boshara SA, Albertini A, Monnerat S, Bessell P, Mori Y, Kubota Y, Ndung'u JM, Cruz I 2018. Sensitive and less invasive confirmatory diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *PLoS Negl Trop Dis* 12(2): e0006264. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006264>.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-77.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 16: 223-229. doi:10.1006/mcpr.2002.0415.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9(6):255-62.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28(12).
- Nzelu CO, Cáceres AG, Guerrero-Quincho SG, Tineo-Villafuerte E, Rodriguez-Delfin L, Mimori T, Uezato H, Katakura K, Gomez EA, Guevara AG, Hashiguchi Y, Kato H 2016. A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. *Acta Trop* 153: 116-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.013>.
- Nzelu CO, Gomez EA, Cáceres AG, Sakurai T, Martini-Robles L, Uezato H, Mimori T, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H 2014. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. *Acta Trop* 132: 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.016>.
- Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A, Brodskyn C 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: leishmaniasis. *Drug Discov Today: Disease Models* 1(1): 81-86. doi: 10.1016/j.ddmod.2004.07.005.

- Oliveira Neto MP, Marzochi MC, Grimaldi Júnior G, Pacheco RS, Toledo LM, Momen H 1986. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Ann Trop Med Parasitol* 80(6): 587-92.
- Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017 Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&Itemid=40754](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754).
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PVL, Morita K 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol* 18: 407–421. doi: 10.1002/rmv.593.
- Pereira VR, Reis LC, Souza MA, de Oliveira AP, de Brito ME, Lage PS, Andrade MC, Rocha RD, Martins-Filho OA 2012. Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74:292–298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.025>.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 15;321(5891):970-4.
- Pires MQ, Madeira MF, Bittencourt VP, Pacheco RS 2014. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. *Rev Soc Bras Med Trop* 47(2): 243-246.
- Quaresma PF, de Brito CFA, Rugani JMN, Freire JM, Baptista RP, Moreno EC, Gontijo RC, Rego FD, Diniz JE, Melo MN, Gontijo CMF 2018. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. *Parasitology* 145: 1161-1169. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000276>.
- Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, Silva SR, Júnior AJM, Neto RGT, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CMF 2011. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 105: 579–585. doi:10.1016/j.trstmh.2011.07.005.
- Rangel EF, Lainson R 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7).
- Reithinger R, Dujardin JC 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 45: 21-25.
- Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Finkelstein LC, Gomes-Silva A, Galvão JGV, Pirmez C, Da-Cruz AM, Pinto EF 2014. A comparative evaluation of lesion development, tissue damage and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect Immun* doi:10.1128/IAI.02083-14.

- Romero GAS, de la Glória Orge Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macêdo V, de Carvalho EM 2005. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 93: 49–56. doi:10.1016/j.actatropica.
- Sanches LC, Martini C, Nakamura A, Santiago MB, Lima BD, Lima VM 2016. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Braz J Vet Parasitol* 25(4): 465-469. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016071>.
- Saraiva L, Silva Reis A, Marteleto Nunes Rugani J, Sampaio Pereira AA, Rêgo FD, Vianna Mariano da Rocha Lima AC, Gontijo CMF, Andrade Filho JD 2015. Survey of sand flies (Diptera: Psychodidae) in an environmentally protected area in Brazil. *PLoS One* 10<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134845>. e0134845.
- Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI 2005. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg* 73: 82-86.
- Savani EM, Nunes VB, Galati EB, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM 2009. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol* 160: 18-24.
- Schönlank G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 349–358. doi:10.1016/S0732-8893(03)00093-2.
- Serafim TD, Coutinho-Abreu IV, Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG 2018. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiol* 3:548–555.
- Shirian S, Oryan A, Hatam GR, Daneshbod Y 2012. Mixed Mucosal Leishmaniasis Infection Caused by *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. *J Clin Microbiol* 50(11): 3805-3808.
- Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB 2011. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 179: 257-261.
- Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB 2011. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 179: 257-261.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP 2004. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research* 2:251-257.



- Silveira FT, Lainson R, Corbett C 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(3): 239-251.
- Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Ribeiro RSM 1984. Leishmaniose cutânea na Amazônia. Registro do primeiro caso humano de infecção mista, determinado por duas espécies distintas de *Leishmania*: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 26(5): 272-275.
- Singh S, Sivakumar R 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med* 49(1): 55-60.
- Soliman MFM 2006. The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta Tropica* 97: 146–150.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C 1996. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 3(4):387-91.
- Souza AP, Soto M, Costa JML, Boaventura VS, Oliveira CI, Cristal JR, Barral-Netto M, Barral A 2013. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. *PLoS ONE* 8(6): e66110.
- Souza NA, Leite RS, Silva SO, Penna MG, Vilela LF, Melo MN, Andrade AS 2019. Detection of mixed *Leishmania* infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. *Acta Trop* 193: 12-17. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.016>.
- Skeiky YA, Benson DR, Guderian JA, Whittle JA, Bacelar O, Carvalho EM, Reed SG 1995. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shockproteins of *Leishmania* species and humans. *Infect Immun* 63, 4105–4114.
- Sriworarat C, Phumee A, Mungthin M, Leelayoova S, Siriyasatien P 2015. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of *Leishmania* infection. *Parasit Vectors*. doi 10.1186/s13071-015-1202-x.
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G 2004. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *J Infect Dis* 189: 1729-1733.
- Sundar S, Rai M 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(5): 951-8.
- Tafuri WL, Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL 2001. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol* 96: 203-212.
- Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Ekram AR, Hashighuchi Y, Noiri E, Kimura E 2009. Sensitive, Specific, and Rapid Detection of *Leishmania donovani* DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Am J Trop Med Hyg* 81(4): 578-582. doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0145.

- Tao ZY, Zhou HY, Xia H, Xu S, Zhu HW, Culleton RL, Han E, Lu F, et al. 2011. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasit Vectors* 4(1):115.
- Tiwananthagorn S, Kato H, Yeewa R, Muengpan A, Polseela R, Leelayoova S 2017. Comparison of LAMP and PCR for molecular mass screening of sand flies for *Leishmania martiniquensis* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112(2): 100-107. doi: 10.1590/0074-02760160254.
- Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, Floeter-Winter LM, Shaw JJ 2007. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 149(3-4):280-4.
- Valdivia HO, Almeida LV, Roatt BM, Reis-Cunha JL, Pereira AS, Gontijo C, Fujiwara RT, Reis AB, Sanders MJ, Cotton JÁ, Bartholomeu DC 2017. Comparative genomics of canine isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep40804.
- Van der Auwera G and Dujardin JC 2015. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 28(2): 265-294. doi:10.1128/CMR.00104-14.
- Van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, De Vries HJC, Ozbel Y, Lai a Fat RFM, Coelho LIARC, Kasi M, Shalig HDFH 2005. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *J Clin Microbiol* 43(11): 5560-5566.
- Verma S, Avishek K, Sharma V, Negi NS, Ramesh V, Salotra P 2013. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75: 390-395. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.011>.
- Verma S, Singh R, Sharma V, Bumb RA, Negi NS, Ramesh V, Salotra P 2017. Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of *Leishmania* infection. *BMC Infect Dis*. doi 10.1186/s12879-017-2318-8.
- Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ 2004. PCR–RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous Leishmaniasis. *Acta Trop* 90: 31–37.
- Weigle KA, de Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D’Alessandro A 1987. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg* 36: 489–496.
- Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz M, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME 2011. Serial Quantitative PCR Assay for Detection,

Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. *J Clin Microbiol* 49(11): 3892-3904. doi:10.1128/JCM.r00764-11.

- WHO 2017 - World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em Dezembro de 2017.
- Zurita AI, Rodríguez J, Pinero JE, Pacheco R, Carmelo E, del Castillo A, Valladares B 2003. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene: Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513–663). *J Parasitol* 89: 372–378.

## 8 Anexo

Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA):



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 129 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Hamster como modelo experimental de infecção mista por *L. amazonenses* e *L. infantum*", que tem como responsável Helida Monteiro de Andrade, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 20/08/2013. Este certificado espira-se em 20/08/2018.

### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 129 / 2013, related to the Project entitled "Hamster as an experimental model of mixed infection by *L. amazonensis* and *L. infantum*", under the supervision of Helida Monteiro de Andrade, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 20/08/2013. This certificate expires in 20/08/2018.

**FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS**

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 20/08/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

Certificado do pedido de patente:



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo:** BR 10 2019 005228 7

## Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	EP_2019_38_R1
<b>Title</b>	Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of <i>Leishmania amazonensis</i> in skin samples
<b>Article type</b>	Research Paper

### Abstract

In Brazil, *Leishmania amazonensis* is one of the etiological agents of tegumentary leishmaniasis, which causes the cutaneous and diffuse cutaneous forms of the disease. However, *L. amazonensis* can cause a wide spectrum of diseases in humans, resulting in cutaneous, mucosal, diffuse, and even visceral leishmaniasis. Besides, this species has also been reported to affect dogs, causing typical symptoms of visceral disease. Unfortunately, the diagnostic of the *Leishmania* species is not routinely performed due to the difficulties of the available methods. In view of this, different molecular methods have been used in an attempt to solve the problem of diagnosis. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a relatively new nucleic acid amplification method, which has been successfully applied in the diagnosis of *Leishmania* spp. infections. However, this is the first work that standardizes a specific LAMP reaction for *L. amazonensis*. The set of primers selected were designed from the kDNA minicircle sequence of the *L. amazonensis* (GenBank: U19810.1). The LAMP assay developed in the present study showed 100% specificity and 89% sensitivity when compared with conventional PCR and was more sensitive than qPCR. In addition, the LAMP reaction developed here was able to amplify a qPCR sample with a parasite load of only 28 parasites in 50 ng of DNA. Consequently, considering the LAMP reaction specific to *L. amazonensis* and several advantages of the method (such as high efficiency, sensitivity and specificity), we believe that this reaction can be used as a promising diagnostic tool in clinical practice, field studies, and research.

<b>Keywords</b>	LAMP, <i>Leishmania amazonensis</i> , molecular methods, specific diagnosis
<b>Corresponding Author</b>	Helida Andrade
<b>Corresponding Author's Institution</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>Order of Authors</b>	Jordanna Celeste, Roberta Caldeira, Simone Pires, Karine Silveira, Rodrigo Soares, Helida Andrade

## Submission Files Included in this PDF

### File Name [File Type]

Cover letterCeleste et al.,2019EP.doc [Cover Letter]  
response to editor EP2019.pdf [Response to Reviewers]  
HighlightsEP2019.pdf [Highlights]  
GraficalAbstEP2019.tif [Graphical Abstract]  
Celesteetal.2018 Exp.parasitol.REV1.docx [Manuscript File]  
Fig1Rev.tif [Figure]  
Fig2.tif [Figure]  
Fig3.tif [Figure]  
Fig4.tif [Figure]  
Fig5.tif [Figure]  
Fig6.tif [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.