

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

MARCELLA REZENDE RODRIGUES

Avaliação da proteína Prohibitina de *Leishmania infantum* como biomarcador para o diagnóstico sorológico das leishmanioses

BELO HORIZONTE

2018

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

MARCELLA REZENDE RODRIGUES

Avaliação da proteína Prohibitina de *Leishmania*
infantum como biomarcador para o diagnóstico
sorológico das leishmanioses

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da UFMG, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre no referido Programa.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Costa Duarte

Co-orientadores: Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof. Dr. Daniel Menezes Souza

Belo Horizonte

2018

R696a Rodrigues, Marcella Rezende.
Avaliação da proteína Prohibitina de *Leishmania infantum* como biomarcador para o diagnóstico sorológico das leishmanioses [manuscrito]. / Marcella Rezende Rodrigues. - - Belo Horizonte: 2018.
78 f.: il.
Orientador (a): Mariana Costa Duarte.
Coorientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho; Daniel Menezes Souza
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmania. 2. Testes Sorológicos. 3. Proteínas Recombinantes. 4. Imunidade Humoral. 5. Biomarcadores. 6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 7. Dissertação Acadêmica. I. Duarte, Mariana Costa. II. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. III. Souza, Daniel Menezes. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WR 350



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

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA MARCELLA REZENDE RODRIGUES

Realizou-se, no dia 10 de janeiro de 2018, às 14:00 horas, sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 327ª defesa de dissertação, intitulada "*Avaliação da proteína Prohibitina de Leishmania infantum como biomarcador para o diagnóstico sorológico das leishmanioses*", apresentada por MARCELLA REZENDE RODRIGUES, número de registro 2016714764, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Mariana Costa Duarte - Orientadora (UFMG), Prof. Daniel Menezes Souza – Coorientador (UFMG), Dra. Ana Paula Morais Martins Almeida (UFMG), Dr. Matheus Fernandes Costa Silva (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

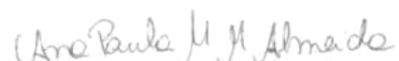
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 10 de janeiro de 2018.


Profa. Mariana Costa Duarte


Prof. Daniel Menezes Souza


Dra. Ana Paula Morais Martins Almeida


Dr. Matheus Fernandes Costa Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

Vice-reitora: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-reitora de Pós-graduação: Prof. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Ado Jório

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Tarcízio Afonso Nunes

Vice-diretor: Prof. Dr. Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-graduação: Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco

Subcoordenador do Centro de Pós-graduação: Prof. Selmo Geber

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

Coordenador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Vice-Coordenador: Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Profa. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof. Unai Tupinambás

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

Thaís Teodoro de Oliveira Santos (representante discente)

Dedico este trabalho à Deus, meu Pai fiel e amável e aos meus pais, minha fonte de amor incondicional e inesgotável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por seu amor, por sua fidelidade, por me amar independente das minhas falhas e por ser minha sustentação e amparo de todos os momentos;

Aos meus pais, minha fonte de amor inesgotável e incondicional, por se doarem por mim e fazerem dos meus sonhos, os seus;

Ao meu irmão, por ser meu ombro amigo, parceiro de vida e por saber que te tenho comigo para tudo, independente do que for;

À Adeliane, por ser uma amiga-irmã que compartilha comigo alegrias e tristezas;

À Floquinho, por ser meu companheirinho, amigo fiel e fonte de alegria;

À minha orientadora Mari, por não medir esforços para me ajudar, pelos conselhos e oportunidades que me proporciona e por estar junto comigo nessa, me auxiliando e me apoiando;

Ao meu co-orientador Eduardo pela ajuda de sempre, pelo exemplo, aprendizado, por ter me recebido desde a IC no Lab de portas abertas.

Ao meu co-orientador Daniel, por estar sempre solícito em me ajudar com minhas dúvidas, explicar com paciência e colaborar com a realização do meu projeto;

À toda minha família e amigos por todo carinho e torcida;

Aos amigos de laboratório, Fer, Lucas, Kei, Dani, Gui, Pimpim, Pati, Daniel, Ana Lets, Vivi, Fe Ludolf, Debs, Grasi e DaniV pela convivência, pelos momentos felizes, por toda ajuda, colaboração e compreensão nos momentos de estresse;

À minha amiga Fernanda, por ter me amparado desde a graduação, por me acalmar, me impulsionar e segurar minha mão, sem você seria muito mais difícil;

Aos meus amigos Lucas e Kei, por toda ajuda que sempre me propuseram, pelas nossas bobadeiras diárias, pela nossa amizade que é tão especial para mim, por me fazerem mais feliz e por terem abraçado esse projeto como se fosse de vocês também;

Ao Programa de Pós-graduação PPGIM; à UFMG; instituições de auxílio à pesquisa, especialmente à CAPES, à todos os colaboradores desse projeto por tornarem esse sonho real;

Meu muito obrigada!!!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

As leishmanioses são doenças de alta morbidade e mortalidade, endêmicas no Brasil, causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. Os testes sorológicos atuais dessas doenças são limitados no que se refere à sua sensibilidade e/ou especificidade. Um teste de diagnóstico sorológico padrão ouro para leishmaniose deve ser focado em marcadores que apresentam uma resposta humoral específica em hospedeiros infectados com boa sensibilidade, especificidade, baixo custo e rapidez. Um estudo imunoproteômico recente, utilizando *Leishmania infantum*, foi realizado com soro de cães com leishmaniose visceral assintomática e sintomática (LVC) e proteínas antigênicas do parasito foram identificadas. A Prohibitina foi identificada em extratos de amastigotas-like e reconhecida pelos soros de cães com LV. No presente estudo, a Prohibitina foi avaliada em sua forma recombinante, além de ter seu epítipo conformacional de linfócitos B da proteína sintetizado (Peptídeo) e também avaliado como biomarcador diagnóstico. O extrato solúvel (SLA) de *L. infantum* para LV e *L. braziliensis* para LT foram utilizados como antígenos comparativos. Para o diagnóstico de LVC foram utilizados soros de cães LV assintomática ou sintomática; soros de cães saudáveis de áreas endêmicas ou não endêmicas de leishmaniose; soros de cães saudáveis vacinados com Leish-Tec® e soros de animais infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi* ou *Ehrlichia canis*. Para o diagnóstico de LT, foram utilizados soros de pacientes com leishmaniose cutânea ou mucocutânea; soros de indivíduos saudáveis que vivem em uma área endêmica de leishmaniose, como controles e; soros de indivíduos com doença de Chagas. Os experimentos ELISA foram realizados com a proteína recombinante Prohibitina (*r*Prohibitina) e seu peptídeo sintético (Peptídeo), que apresentaram alta sensibilidade e especificidade para ambas as formas da doença, com melhor potencial de diagnóstico em comparação com o antígeno comparativo SLA. Dessa forma, a proteína recombinante Prohibitina e seu peptídeo sintético podem ser considerados como candidatos potenciais para a melhoria do diagnóstico sorológico da LVC e LT.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar, Leishmaniose Visceral Canina, diagnóstico, proteína recombinante, peptídeo sintético.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases of high morbidity and mortality, endemic in Brazil, caused by parasites of the genus *Leishmania*. Current serological tests for these diseases are limited in regard to their sensitivity and/or specificity. A gold standard serological diagnostic test for leishmaniasis should be focused on markers that present a specific humoral response in infected hosts with good sensitivity, specificity, low cost and rapidity. A recent immunoprotective study using *Leishmania infantum* was performed with serum from dogs with asymptomatic and symptomatic visceral leishmaniasis (CVL) and antigenic proteins of the parasite were identified. Prohibitin was identified in extracts of amastigotes-like and recognized by sera from dogs with VL. In the present study, Prohibitin was evaluated in its recombinant form, in addition to having its conformational epitope of protein B lymphocytes synthesized (Peptide) and also evaluated as diagnostic biomarker. The soluble extract (SLA) from *L. infantum* to VL and *L. braziliensis* to TL were used as comparative antigens. For the diagnosis of CVL, sera from dogs asymptomatic or symptomatic VL were used; sera from healthy dogs from endemic or non-endemic areas of leishmaniasis; sera from healthy dogs vaccinated with Leish-Tec® and sera from animals experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* or *Ehrlichia canis*. For the diagnosis of LT sera from patients with cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis were used; sera from healthy individuals living in an endemic area of leishmaniasis, such as controls; sera from individuals with Chagas' disease. The ELISA experiments were performed with the recombinant Prohibitin protein (rProhibitin) and its synthetic peptide (Peptide), which showed high sensitivity and specificity for both forms of the disease, with better diagnostic potential compared to the comparative SLA antigen. Thus, the recombinant protein Prohibitin and its synthetic peptide can be considered as potential candidates for the improvement of the serological diagnosis of CVL and TL.

Keywords: Tegumentary Leishmaniasis, Visceral Canine Leishmaniasis, diagnosis, recombinant protein, synthetic peptide

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
BLAST	Basic local alignment search tool
COLTEC	Colégio Técnico
DAT	Teste de aglutinação direta
DO	Densidade ótica
ELISA	Teste de imunoadsorção enzimática
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFAT	Teste de imunofluorescência Indireta
KMP-11	Proteína de membrana de 11kDa dos cinetoplastídeos
LB	Linfócito B
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LM	Leishmaniose Mucosa
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
NaCl	Cloreto de sódio
OPD	Orto-fenilenodiamina
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato alcalino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>r</i>	Recombinante
ROC	Característica de operação do receptor
RT-PCR	<i>Real time</i> -PCR
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante
SLA	Extrato proteico antigênico solúvel de <i>Leishmania</i> spp.
SLALb	Extrato proteico antigênico solúvel de <i>Leishmania braziliensis</i>
SLALi	Extrato proteico antigênico solúvel de <i>Leishmania infantum</i>

Syn.	Sinônimo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Situação atual da endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo.....	21
Figura 2. Situação atual da endemicidade da Leishmaniose Cutânea no mundo.....	22
Figura 3. Ciclo de vida do parasito da Leishmania.	24
Figura 4. Fluxograma da sequência de experimentos realizada no projeto.....	34
Figura 5. Sequência de aminoácidos da proteína recombinante Prohibitina.....	40
Figura 6. Análise da sequência de aminoácidos da Prohibitina expressa em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> spp. As caixas vermelhas indicam epitopos preditos de linfócitos B na proteína.	46
Figura 7. PCR Prohibitina.	47
Figura 8. Expressão e purificação da proteína recombinante Prohibitina (<i>rProhibitina</i>)...	48
Figura 9. Western-Blot da proteína recombinante Prohibitina (<i>rProhibitina</i>).....	49
Figura 10. Desempenho diagnóstico da proteína <i>rProhibitina</i> , do peptídeo sintético e SLALi para LVC.	51
Figura 11. Desempenho diagnóstico da proteína <i>rProhibitina</i> , do peptídeo sintético e SLALb para LT.	53

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Avaliação do desempenho diagnóstico dos antígenos.....	54
---	----

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2 1.	Epidemiologia das Leishmanioses.....	21
2 2.	Etiologia e o ciclo biológico.....	22
2 3.	Manifestações Clínicas	24
2 4.	Diagnóstico das Leishmanioses.....	26
2.4.1.	Diagnóstico Parasitológico	26
2.4.2.	Diagnóstico Imunológico	27
2.4.3.	Diagnóstico da LVC	28
2.4.4.	Diagnóstico da LT	29
2 5.	Prohibitina	30
3	OBJETIVOS	32
3 1.	Objetivo geral	32
3 2.	Objetivos específicos.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4 1.	Aspectos Éticos	33
4 2.	Delineamento do projeto	33
4 3.	Amostras de soros caninos	34
4 4.	Amostras de soros humanos	35
4 5.	Parasitas.....	35
4 6.	Obtenção e análise das sequências da proteína	36
4 7.	Clonagem do gene da proteína Prohibitina	36
4.7.1.	Extração do DNA genômico dos parasitos.....	36
4.7.2.	Amplificação das sequências gênicas por PCR.....	37
4.7.3.	Ligação do gene em pGEM®-T Easy Vector Systems	38
4.7.4.	Preparo e transformação de bactérias <i>Escherichia coli</i> XL1blue.....	38
4.7.5.	Extração de DNA Plasmidial.....	39
4.7.6.	Sequenciamento do gene	40
4.7.7.	Clonagem do gene em vetor de expressão.....	40
4 8.	Expressão e Purificação da proteína recombinante	41
4 9.	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	42

4 10.	Western-Blot.....	42
4 11.	ELISA para Diagnóstico da LVC.....	43
4 12.	ELISA para Diagnóstico da LT.....	43
4 13.	Análise Estatística.....	44
5	RESULTADOS.....	46
5 1.	Análise das Sequências em Bancos de Dados.....	46
5 2.	Amplificação do gene de Prohibitina por PCR.....	47
5 3.	Expressão e purificação da proteína recombinante.....	47
5 4.	Proteína Prohibitina (XP_001468827) e peptídeo sintético para o diagnóstico sorológico das leishmanioses.....	49
5.4.1.	Desempenho de <i>r</i> Prohibitina e de seu peptídeo sintético no diagnóstico de leishmaniose visceral canina.....	49
5.4.2.	Desempenho diagnóstico da <i>r</i> Prohibitina e de seu peptídeo sintético no diagnóstico sorológico da LT.....	52
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÃO.....	61
8	PERSPECTIVAS.....	62
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
10	ANEXOS.....	74
	ANEXO 1: Comprovante de aprovação do projeto pelo CEUA da UFOP.....	74
	ANEXO 2: Comprovante de aprovação do projeto pelo COEP da UFMG.....	75
	ANEXO 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76
	ANEXO 4: Artigo Submetido.....	78

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias provocadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e, caracterizadas por uma alta morbidade e mortalidade no mundo, sendo aproximadamente 380 milhões de pessoas, em 98 países, sob o risco de contrair a infecção (ALVAR *et al.*, 2012).

As formas clínicas da doença dependem predominantemente das espécies infectantes, mas também são influenciadas pelos aspectos genéticos e pela resposta imune do hospedeiro (KAYE; SCOTT, 2011). As leishmanioses compreendem dois grandes grupos de doenças distintas que podem apresentar amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde formas cutâneas localizadas, disseminadas, difusas e mucosas no caso da leishmaniose tegumentar (LT), sendo *Leishmania braziliensis* uma das principais espécies da doença no Brasil; ou de forma sistêmica, com o envolvimento de órgãos como fígado e baço em casos de leishmaniose visceral (LV), causada principalmente pela espécie *Leishmania infantum* no Brasil (CUNNINGHAM *et al.*, 2012; DESJEUX, 2004).

No Brasil a LV é uma doença zoonótica com elevada incidência sendo os cães considerados importantes reservatórios do parasito. O aumento da leishmaniose visceral canina (LVC) na última década tornou essa doença epidemiologicamente relevante. Os cães podem ser classificados como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, ou com alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo, mas com intensa carga parasitária na pele, gerando maior dificuldade no diagnóstico e, conseqüentemente, dando continuidade ao ciclo da doença. (GONTIJO; MELO, 2004; FARIA *et al.*, 2011).

Visando o controle das leishmanioses, o Ministério da Saúde preconiza algumas estratégias para controle e combate, sendo as principais medidas: o diagnóstico clínico-laboratorial da doença, seguido do tratamento dos casos humanos, uso de inseticidas nas áreas de circulação do vetor, a identificação e sacrifício de cães infectados e medidas educativas para a população. Entretanto, as medidas de controle contra a LVC que são atualmente empregadas, não têm demonstrado eficiência para diminuir o número de casos de cães infectados, não reduzindo, dessa forma, a incidência da doença no Brasil (COURA-VITAL *et al.*, 2014, GRIMALDI *et al.*, 2012; LAURENTI *et al.*, 2013).

A detecção do agente causador de toda doença infecciosa é um passo determinante para o manejo clínico e/ou monitoramento da doença. O diagnóstico das leishmanioses representam um motivo de preocupação constante da saúde pública mundial, pois o número de casos de falha terapêutica ao tratamento convencional tem aumentado, tanto para a LV quanto para a LT (ALVAR *et al.*, 2006). O diagnóstico das leishmanioses, inclui detecção do parasito nos tecidos, culturas *in vitro*, inoculação em animais experimentais, testes moleculares e sorológicos (SAKKAS; GARTZONIKA; LEVIDIOTOU, 2016). Entretanto, nenhum método atualmente disponível para o diagnóstico da doença apresenta todas as características desejáveis, como sensibilidade e especificidade elevadas, além de apresentar facilidade de execução e baixo custo. Esse fato enfatiza a importância da associação dos exames imunológicos, parasitológicos, e moleculares, a fim de se alcançar taxas elevadas de positividade no diagnóstico da doença (COTA *et al.* 2013).

Atualmente, o diagnóstico da LVC, baseia-se no protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde, que determina o uso do teste rápido imunocromatográfico contendo os antígenos recombinantes rK26 e rK39, o DPP® Dual-Path Platform (DPP; Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) para o screening de cães infectados e a ELISA para confirmar os resultados positivos (BELO *et al.*, 2017; GRIMALDI *et al.*, 2012). Entretanto, esses testes não apresentam acurácia desejada para o diagnóstico de animais assintomáticos, e outros, mesmo clinicamente curados, podem-se permanecer soropositivos por longos períodos de tempo (COURA-VITAL *et al.*, 2014; FERRER *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2011; VIOL *et al.*, 2012).

O diagnóstico da LT baseia-se na combinação de dados epidemiológicos, avaliação clínica e métodos laboratoriais (parasitológicos e imunológicos), já que não existe um teste padrão-ouro para o diagnóstico preciso da doença (DAVID; CRAFT, 2009). Atualmente, não existe um antígeno padronizado para o diagnóstico sorológico da LT, sendo muitas vezes utilizados extratos solúveis do parasito, o que torna variável a especificidade do teste, principalmente, devido a ocorrência de reatividade cruzada. Além disso, indivíduos saudáveis residentes em área endêmica da doença podem ser considerados falsos-positivos em ensaios sorológicos, visto que podem apresentar baixos a moderados títulos de anticorpos anti-*Leishmania* (BRITO *et al.*, 2000; COLMENARES *et al.*, 2002; GOTO; LINDOSO, 2010).

Dessa forma, os testes de detecção baseados em antígenos ou anticorpos, como os imunoenaios enzimáticos (ELISA), apresentam vantagens, no entanto, quando os

extratos antigênicos do parasito são empregados, os testes sorológicos apresentam problemas em sua sensibilidade e/ou especificidade. Esses testes apresentam vantagens por serem menos invasivos e com menos risco para os pacientes quando comparada às outras metodologias, além de ser uma técnica de fácil execução, menor tempo, além da possibilidade de padronização (FARAHMAND *et al.*, 2015; MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm buscado novos antígenos para o diagnóstico sorológico, como aqueles derivados de proteínas purificadas, visando melhorar a especificidade dos testes sorológicos (CARVALHO *et al.*, 2017; FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016; GOMES *et al.*, 2008). O uso de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos mostraram eficácia variável no diagnóstico sorológico das leishmanioses, sendo alguns desses antígenos aplicáveis para o diagnóstico de ambas as doenças, em humanos e cães (CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2016; FARIA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.* 2015; MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014). Sendo assim, uma maior otimização e novos candidatos sorológicos são desejáveis para alcançar um desempenho de alto rendimento para a detecção sorológica da leishmaniose canina e humana (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

Nesse contexto, em uma abordagem imunoproteômica recente, proteínas de *L. infantum* foram identificadas em extratos de formas promastigotas e amastigotas do parasito, sendo reconhecidas por soros de cães com LV, dentre essas, a Prohibitina (XP_001468827), reconhecida em extratos de amastigotas-like (COELHO *et al.*, 2012). Pretende-se, então, expandir o painel de antígenos disponíveis para o diagnóstico das leishmanioses através da avaliação da proteína Prohibitina, na sua forma recombinante, bem como de seu peptídeo sintético, para o diagnóstico de formas caninas e humana da doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia das Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença de distribuição mundial, encontrada em cerca de 98 países. Estima-se que 12 a 15 milhões de pessoas no mundo estão infectadas; 350 milhões estão em risco de adquirir a doença e; que haja uma incidência aproximada de 0,2 a 0,4 e 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose visceral (LV) e tegumentar (LT), respectivamente, por ano (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2017).

Dados de até 2015 indicam que 90% dos casos de LV ocorreram em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão e que cerca de 87% dos casos de LT ocorreram no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe da Síria, Tunísia e Iêmen; sendo o Brasil responsável por 95% dos casos de LV do continente americano. (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

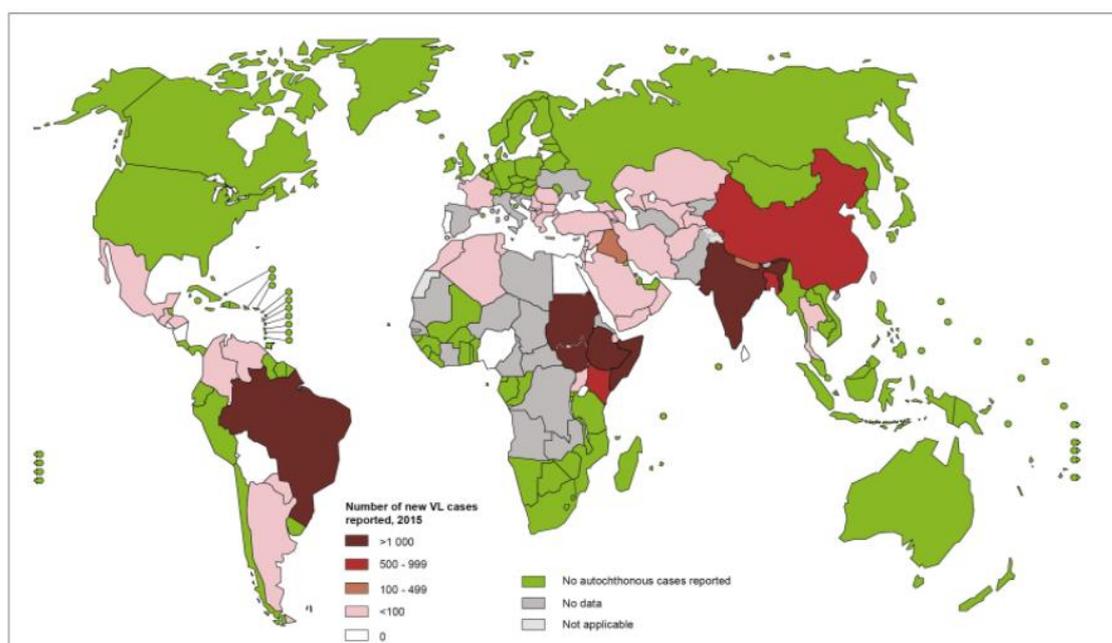


Figura 1. Situação atual da endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo.
Fonte: WHO, 2015.

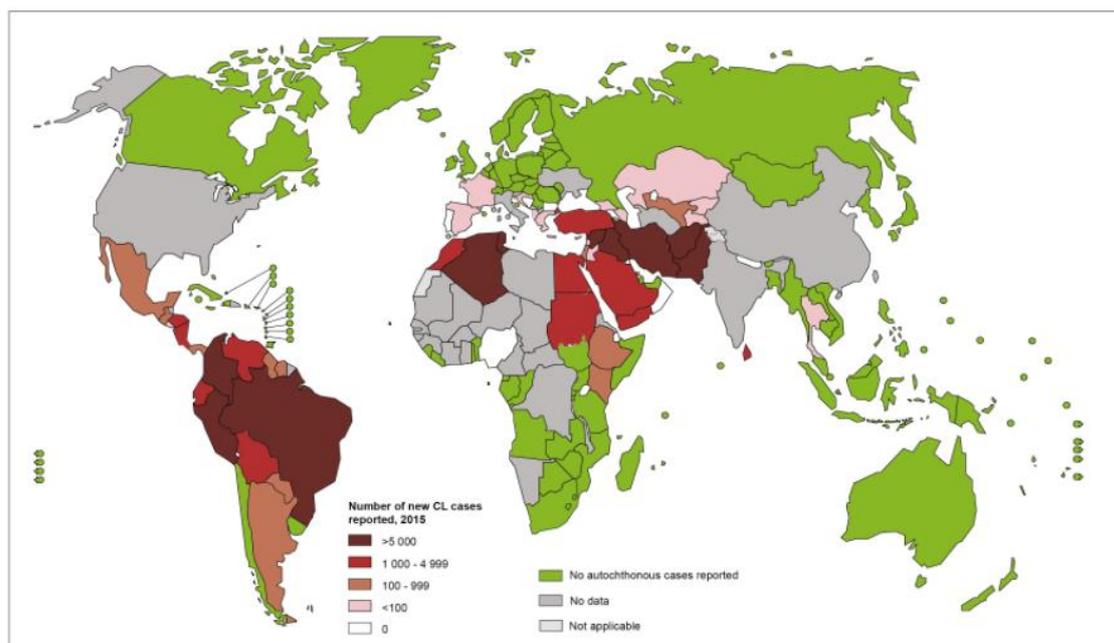


Figura 2. Situação atual da endemicidade da Leishmaniose Cutânea no mundo.
Fonte: WHO, 2015.

A LV pode apresentar em duas formas, zoonótica, sendo os cães os principais reservatórios e antroponótica causados pelas espécies *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) donovani*, respectivamente. No Brasil, a dispersão da LVC entre cães possui uma relação direta com a incidência da doença no homem, pois os cães infectados servem como reservatório de leishmaniose humana (BANETH *et al.*, 2008; SANTINI *et al.*, 2010; TEIXEIRA NETO, 2010; WERNECK *et al.*, 2014).

2.2. Etiologia e o ciclo biológico

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, Sub-Reino *Protozoa*, Filo *Sarcomastigophora*, Ordem *Kinetoplastida* e Família *Trypanosomatidae*. O vetor transmissor é um inseto da Ordem *Diptera*, Família *Psychodidae*, Sub-Família *Phlebotominae*, pertencente aos gêneros *Phlebotomus*, em países do “Velho Mundo” e *Lutzomyia*, nas Américas (GRIMALDI; TESH, 1993).

Existem cerca de 30 espécies de flebotomíneos comprovadas como vetores dos parasitos causadores de leishmanioses no mundo, sendo que algumas destas possuem estreita relação com algumas espécies de *Leishmania*, bem como seus reservatórios (DESJEUX, 2004). As espécies *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* são responsáveis pela leishmaniose tegumentar (LT), enquanto *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*

(conhecida como *Leishmania chagasi* na América do Sul) causam leishmaniose visceral (LV) (KAYE; SCOTT, 2011).

A *Leishmania* é um parasito difásico que completa seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vetor flebotomíneo, que abriga a forma promastigota extracelular flagelada e; um mamífero, onde a forma de amastigota intracelular se desenvolve (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). As formas flageladas e móveis de *Leishmania* spp. são chamadas de promastigotas. Elas são encontradas no vetor e progridem através de vários estágios de diferenciação morfológicamente distintos para se tornarem as promastigotas metacíclicas, que são as formas infecciosas transmitidas pelo vetor no repasto sanguíneo. As amastigotas não possuem flagelo exteriorizado e vivem como parasitos intracelulares em uma variedade de células de mamíferos, principalmente nos macrófagos (KAYE; SCOTT, 2011).

Em relação ao ciclo de vida do parasito, na porção anterior do intestino médio do vetor, as formas promastigotas procíclicas diferenciam-se, no interior do flebotomíneo, em promastigotas metacíclicas infecciosas e não divisórias. Durante o repasto sanguíneo, o inseto regurgita promastigotas metacíclicas juntamente com componentes salivares. As promastigotas metacíclicas são então fagocitadas por células mononucleares presentes no local, principalmente macrófagos. O ciclo da transmissão está completo quando os fagócitos infectados com amastigotas são absorvidos por outro flebotomíneo e, em seguida, convertidos em promastigotas no intestino médio (KAYE; SCOTT, 2011). Somente as fêmeas são hematófagas, enquanto os machos se alimentam de seiva e néctar. Em relação aos cães, o vetor se alimenta principalmente em áreas de pelos escassos, como a cabeça, nariz, orelha, região inguinal e áreas perianais (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

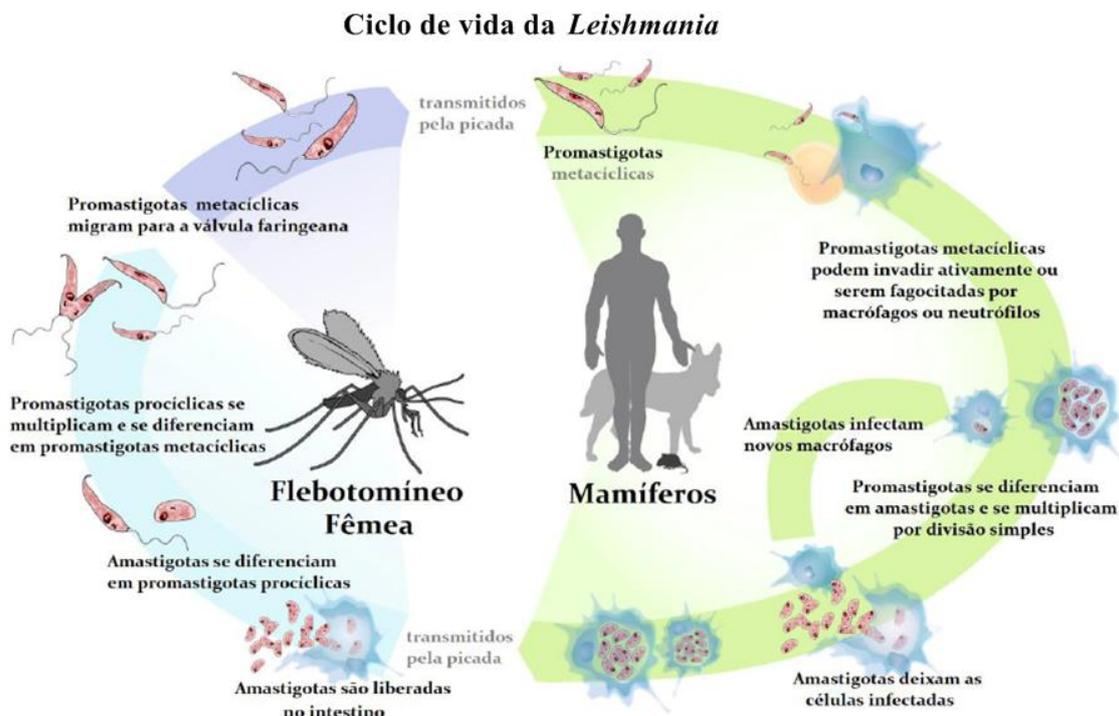


Figura 3. Ciclo de vida do parasito da *Leishmania*.
Fonte: HARHAY et al. (2011) (Adaptado).

2.3. Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas são determinadas pela espécie infectante e fatores relacionados ao hospedeiro, tais como o estado geral de saúde, genética e o sistema imune (TRIPATHI; SINGH; NAIK *et al.*, 2007).

Na apresentação clínica da LT, a doença pode-se manifestar sobre três formas clínicas: a LC, a LM e LCD da doença. A LC é a forma mais comum da doença e surge após um período de incubação variável de 10 dias a três meses, como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo. São frequentes as ulcerações com bordas elevadas, endurecidas e fundo com tecido de granulação grosseira, configurando a clássica lesão com borda em moldura. (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Cerca de 1 a 5% dos pacientes podem desenvolver LM, devido à capacidade que algumas espécies do parasito possuem de migrar para mucosas e causar extensa destruição tecidual (SCHUBACH *et al.*, 1998; MENDONÇA *et al.*, 2004). A LCD é uma forma em que as lesões apresentam-se como nódulos, de forma anérgica e que raramente ulceram. As lesões espalham-se por todo o corpo e este quadro pode estar relacionado com a ineficiência ou ausência de resposta celular do sistema imune do hospedeiro

(DESJEUX, 2004). Devido às frequentes recidivas, tornou-se um grave problema de Saúde Pública, juntamente com as demais formas clínicas, pois além da ampla distribuição geográfica, o hospedeiro infectado pode apresentar lesões desfigurantes e incapacitantes (DESJEUX, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Na LM, as lesões podem levar à destruição parcial ou total das mucosas do nariz, cavidades da boca e garganta e tecidos circundantes. É considerada uma forma clínica de difícil tratamento e prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura. O acometimento mucoso pode surgir com a lesão cutânea ainda em atividade ou anos após sua cicatrização. Dentre as lesões mucosas, distinguem-se as seguintes variedades: forma úlcero-infiltrante, poliposa e terebrante. (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A LV é caracterizada por episódios irregulares de febre, perda substancial de peso, inchaço do baço e fígado e anemia, que pode ser grave. Se a doença não for tratada, a taxa de mortalidade em países em desenvolvimento pode chegar a 100% em 2 anos (WHO, 2017). A LV caracteriza-se por um amplo espectro clínico, que pode variar desde as manifestações clínicas assintomáticas, passando pelas oligossintomáticas, até às formas sintomáticas graves, que, quando agudas e não tratadas, podem levar o paciente ao óbito (GONTIJO; MELO, 2004). A forma crônica da doença é também denominada Kalazar clássica, que apresenta evolução prolongada. Esta se caracteriza por febre irregular, emagrecimento progressivo, hepatoesplenomegalia, edema generalizado, dispneia, cefaleia, dores musculares, dentre outros sintomas (ASHFORD, 2000; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Na LVC, os cães podem ser assintomáticos (ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*), oligossintomáticos (presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pelo opaco) e sintomáticos, todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose). Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo mas com intensa carga parasitária na pele (CIARAMELLA *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2009). Todos os sinais clínicos aparecem em proporções variadas em cães sintomáticos e cada caso não necessariamente mostra todos esses, embora, na grande maioria dos casos, a doença comece com sintomas cutâneos e evolua para sintomas viscerais após um período de pré-patência variável (OLIVA *et al.*, 2006).

2 4. Diagnóstico das Leishmanioses

Apesar dos avanços científicos as leishmanioses ainda constituem um importante problema de saúde pública. O diagnóstico das leishmanioses consiste em um grande desafio, e depende da associação clínica, epidemiológica e laboratorial. Particularmente em relação ao diagnóstico laboratorial, existe uma ausência de um teste que seja considerado como padrão-ouro para o diagnóstico dos casos humanos e caninos, o que se torna um problema para o controle dessa doença. Além disso, o diagnóstico precoce é fundamental para evitar danos permanentes e graves sequelas funcionais e reduzir a prevalência da doença (ALVAR *et al.*, 2006).

2.4.1. Diagnóstico Parasitológico

A observação das formas evolutivas do parasito é essencial para demonstrar a origem da doença, sendo considerada como um método de certeza para o diagnóstico das leishmanioses (SOLCÀ *et al.*, 2012). O diagnóstico parasitológico consiste na visualização direta das formas amastigotas do parasito em esfregaços de aspirado de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados por Giemsa, Leishman ou Panótico®. É uma forma segura, simples, rápida, considerada um teste de confirmação clássico para a LV, que apresenta alta especificidade, entretanto, sua sensibilidade é influenciada pela experiência do analista técnico de laboratório, qualidade dos reagentes, grau do parasitismo, tipo de material biológico coletado e do seu processamento e coloração (LAURENTI, 2009; SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Quando não é possível demonstrar a presença do agente infeccioso por microscopia ou através da obtenção do cultivo, pode-se recorrer à detecção dos ácidos nucleicos dos parasitos, utilizando-se a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) (LOPEZ *et al.*, 1993; SUDARSHAN *et al.*, 2014). É um dos métodos mais sensíveis e mais específicos para o diagnóstico clínico de LV, que amplifica o DNA do parasito visando regiões conservadas específicas de *Leishmania*. O teste permite a detecção sensível e específica do parasito, independentemente da espécie ou do gênero (LAURENTI, 2009; SRIVASTAVA *et al.*, 2011). Os fatores limitantes dessa técnica são restringidos aos laboratórios bem equipados, em parte, devido à sua complexidade técnica; baixa sensibilidade do método, devido à baixa carga do parasito ou à ausência provisória do mesmo; além do elevado custo e difícil emprego em larga escala, principalmente para

triagem em campo (DE RUITER *et al.*, 2014; GONTIJO; MELO, 2004; MONDAL, 2010).

2.4.2. Diagnóstico Imunológico

A base do diagnóstico imunológico é detectar antígenos ou anticorpos anti-leishmaniais nas amostras de sangue. O teste da imunofluorescência indireta (IFAT), testes imunoenzimáticos (ELISA) e testes imunocromatográficos são os testes mais comuns dessa classe diagnóstica. Os testes sorológicos foram desenvolvidos para substituir métodos parasitológicos, de forma não invasora e com maior sensibilidade (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016; GRIMALDI *et al.*, 2012).

A imunofluorescência indireta (IFAT) consiste na reação de soros com os parasitos fixados em lâminas de microscopia, sendo utilizado um conjugado fluorescente para evidenciação da reação. (GRADONI, 2002; MAIA; CAMPINO, 2008). O IFAT pode ser preciso em áreas não endêmicas, mas sua acurácia diminui em áreas endêmicas devido à complexidade da doença (ADEL *et al.*, 2016), podendo gerar falsos positivos, , assim como resultados falsos negativos, muitas vezes, resultando em propagação da infecção, já que esse teste parece subestimar a verdadeira prevalência de infecção canina, ou levando a eutanásia injustificada de animais não infectados ((DANTAS-TORRES, 2012; GRIMALDI *et al.*, 2012).

O ensaio imunoenzimático ou ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”) consiste na reação de anticorpos com antígenos solúveis e/ou purificados presentes em amostras biológicas. É um teste sensível, rápido, de fácil execução e leitura (EL-AMIN *et al.*, 1986). A sensibilidade e a especificidade da técnica dependem diretamente do antígeno usado (EJAZI; ALI, 2013). Antígenos brutos e solúveis de promastigotas e amastigotas apresentam, comumente, reatividade cruzada com outros grupos de doenças relacionadas e, dessa forma, diversos antígenos recombinantes tem sido clonados e refinados para o diagnóstico da doença (MAIA; CAMPINO, 2008). A técnica de ELISA vem sendo utilizada em substituição ao IFAT, visto as limitações de reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e a dificuldade de adequação para triagem em massa, quando comparado ao ELISA. (BOARINO *et al.*, 2005; FARAHMAND *et al.*, 2015).

2.4.3. Diagnóstico da LVC

Na leishmaniose visceral, o diagnóstico é feito pela abordagem integrada e combinação de sinais clínicos com testes parasitológicos ou sorológicos. (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2017).

O diagnóstico clínico da LVC é complexo porque o espectro de sinais clínicos e anormalidades clínico-patológicas é amplo e, muitas vezes, não específico (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2017). Uma característica importante é a permanência da doença clinicamente inaparente por longos períodos. Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos. (EJAZI; ALI, 2013; GONTIJO; MELO, 2004).

Atualmente, a proteína recombinante mais importante para o sorodiagnóstico da LVC é a rk39, que tem sido empregada tanto para o diagnóstico, como para estudos epidemiológicos em humanos e cães, e candidato vacinal contra a LV (BURNS *et al.*, 1993; SUNDAR *et al.*, 2007). O uso da rK39 têm demonstrado melhores resultados no diagnóstico de cães assintomáticos do que de humanos com a doença na forma sub-clínica (SCALONE *et al.*, 2002).

O diagnóstico da LVC, até 2011, era baseado no uso de IFAT, um método utilizado para confirmar os casos positivos de cães identificados pela técnica de ELISA. A partir de 2011, visto as limitações de IFAT em relação á reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade e, para aumentar a acurácia no diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde determinou o uso do teste rápido imunocromatográfico, contendo os antígenos recombinantes rK26 e rK39, o DPP® Dual-Path Platform (DPP; Bio-Manguinhos/Fiocruz) para o screening de cães infectados e a ELISA, pelo kit EIE-LVC® (Bio-Manguinhos/Fiocruz), constituído de antígenos de *Leishmania* major-like, para confirmar os resultados positivos (BELO *et al.*, 2017; COURA-VITAL *et al.*, 2014; GRIMALDI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011).

Ressalta-se que esses testes apresentam sensibilidade variável nos estágios iniciais da doença e a especificidade dos testes pode ser comprometida quando os mesmos são aplicados em áreas endêmicas da doença; em animais saudáveis, mas vacinados; e em cães infectados com parasitoses relacionadas às leishmanioses como, por exemplo, babesiose, ehrlichiose e doença de Chagas (COURA-VITAL *et al.*, 2014; FERRER *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2011; VIOL *et al.*, 2012).

. Dessa forma, não há disponível um teste de sorodiagnóstico que possa ser considerado padrão-ouro da LVC, o que requer a busca por um diagnóstico que seja preciso, sensível, específico e de baixo custo para a população (BELO *et al.*, 2017; SINGH; SUNDAR, 2015).

2.4.4. Diagnóstico da LT

Um diagnóstico definitivo de LT é feito através da combinação de história clínica, dados epidemiológicos e confirmação laboratorial, por testes parasitológicos e imunológicos. Uma associação entre duas ou mais técnicas fornece um diagnóstico mais válido, visto que os testes atualmente disponíveis não apresentam acurácia o suficiente para serem considerados como padrão-ouro. (GOMES *et al.*, 2014).

A confirmação laboratorial é um elemento crucial para o diagnóstico de LT, visto que várias doenças podem apresentar manifestações semelhantes, produzindo um amplo espectro de lesões, por exemplo, na lepra, câncer de pele, tuberculose e micoses cutâneas, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato e o que ressalta a importância de um diagnóstico diferencial (ABUZOID *et al.*, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003; REITHINGER *et al.*, 2007).

Os testes de diagnóstico parasitológico são específicos, uma vez que demonstram a presença do parasito pela visualização das formas amastigotas em materiais de biópsia, devido à amplificação do DNA do parasito por PCR; pelo cultivo em meios de cultura ou pela inoculação das biópsias em animais de laboratório susceptíveis (BARRAL *et al.*, 1987; LUNEDO *et al.*, 2012; WEIGLE *et al.*, 2002). Entretanto, apesar da elevada especificidade, tais métodos apresentam limitações na sensibilidade, devido à distribuição do parasito não ser homogênea nas amostras teciduais, ao tempo de existência da lesão além da coleta das amostras serem procedimentos invasivos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010).

Os métodos imunológicos da LT incluem o teste de intradermorreação de Montenegro (IDRM) para detectar hipersensibilidade retardada, imunofluorescência indireta (IFAT) e imunoenensaio enzimático (ELISA) para pesquisar anticorpos. Os testes de pesquisa de anticorpos são sensíveis e específicos, tendendo a maior sensibilidade nas infecções causadas por *L. braziliensis* em comparação com doenças causadas por *L. amazonensis*, mas, estão associados à reatividade cruzada com outras doenças, principalmente doença de Chagas e leishmaniose visceral (GOMES *et al.*, 2014).

O IFAT apresenta resultados variáveis na LT, devida à reduzida antigenicidade do parasito ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes e, além disso, as falhas metodológicas e a execução prematura desses exames, nos primeiros momentos de infecção podem explicar as falhas de sensibilidade do teste (GOMES *et al.*, 2014). De maneira geral, a técnica de imunoadsorção por ligação enzimática (ELISA) vem sendo utilizada em substituição ao IFAT, por apresentar melhores parâmetros de sensibilidade e especificidade (GOTO; LINDOSO, 2010).

A técnica de ELISA é considerada uma ferramenta importante para o sorodiagnóstico da LT e monitoramento da exposição dos indivíduos em áreas endêmicas da doença. Assim como para a LV, com o uso de extrato solúvel de *Leishmania* (SLA), a ocorrência de resultados falsos positivos em casos de doença de Chagas foi documentada. Além disso, há uma variação importante no preparo do SLA que reflete na sensibilidade ao ELISA (DIAS *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2017; SOTO *et al.*, 1988).

Com o objetivo de aumentar a especificidade de ELISA no diagnóstico de LV ou LT, através da eliminação de epítomos de reação cruzada, o uso de antígenos recombinantes vem sendo testado. Muitos antígenos recombinantes foram testados quanto ao sorodiagnóstico da LV canina ou humana, no entanto, poucas proteínas recombinantes foram descritas como promissoras para o sorodiagnóstico da LT (LINDOSO *et al.*, 2009; ROMERO *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2010). Alguns antígenos recombinantes como *L. major* Hsp60 (REY-LADINO. *et al.*, 1997) e *L. braziliensis* *Triparedoxin peroxidase* (DUARTE *et al.*, 2015) foram testados e demonstraram resultados promissores para o diagnóstico da LT. O antígeno recombinante *L. infantum* Hsp83 (CELESTE *et al.*, 2004) também foi testado usando um número limitado de amostras cutâneas e mucocutâneas e mostrou 100% de reatividade, curiosamente, sem qualquer reação cruzada com amostras de doença de Chagas. Considerando esses dados, o desenvolvimento de ensaios usando antígenos recombinantes deve ser contemplado (GOTO; LINDOSO, 2010).

2 5. Prohibitina

Em eucariotos superiores, a proteína Prohibitina está envolvida em eventos como a proliferação celular (JOSHI *et al.*, 2003), envelhecimento (COATES *et al.*, 2001),

apoptose (JOSHI *et al.*, 2003), maturação das células B (WOODLOCK *et al.*, 2001) e a manutenção da integridade mitocondrial (NIJTMANS *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado sobre Prohibitina de *L. donovani*, a proteína demonstrou ser uma proteína de superfície ancorada por glicofosfatidilinositol (GPI). A presença de anticorpos anti-Prohibitina durante a interação macrófago-*Leishmania in vitro* reduziu a infecção, demonstrando uma correlação positiva entre a expressão da Prohibitina na superfície e o aumento da infectividade e; além de ser capaz de gerar uma forte resposta humoral em pacientes com leishmaniose visceral (JAIN *et al.*, 2010), o que reforça seu potencial como marcador diagnóstico para a doença.

As ferramentas proteômicas têm sido consideradas importantes para as atribuições funcionais potenciais das proteínas, incluindo aquelas previamente identificadas pela genômica como hipotéticas, o estudo de possíveis alvos de drogas, mecanismos de resistência a medicamentos, identificação de fatores de virulência em parasitos de *Leishmania*, potenciais candidatos à vacinas e novos marcadores para o diagnóstico (AGALLOU *et al.*, 2016; CUERVO *et al.*, 2007). Segundo Negrão, Eberlin e Giorgio (2017), as abordagens proteômicas são capazes de revelar detalhes a nível molecular entre hospedeiros, parasitos e vetores e, com esta tecnologia, pode ser possível selecionar proteínas que podem ser usadas como biomarcadores que caracterizam, por exemplo, lesões cutâneas benignas e lesões cutâneas que se expandiram para as regiões mucosas.

As abordagens imunoproteômicas têm sido usadas como estratégia para identificar novas moléculas de *Leishmania*, onde anticorpos anti-*Leishmania* em soros humanos e caninos reconhecem proteínas relevantes nos extratos de parasitos (ABÁNADES *et al.*, 2012; ALCOLEA *et al.*, 2016; NEGRÃO; EBERLIN; GIORGIO,2017.). Em estudo recente de imunoproteômica realizado pelo nosso grupo de pesquisa (COELHO *et al.*, 2012), a proteína Prohibitina foi reconhecida por soros de cães com leishmaniose visceral, em extrato de amastigotas de *Leishmania infantum*. Uma vez que a forma amastigota é o estágio do parasito que sobrevive dentro dos hospedeiros mamíferos e é responsável pelo desenvolvimento da doença ativa, os pesquisadores têm se concentrado na identificação de proteínas imunorreativas no proteoma de amastigotas (AGALLOU *et al.*, 2016). Todos esses dados sugerem, dessa forma, o potencial da Prohibitina como possível marcador diagnóstico para a doença.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a proteína Prohibitina em sua forma recombinante e seu peptídeo sintético para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina e da leishmaniose tegumentar.

3.2. Objetivos específicos

- Clonar, expressar e purificar o gene da proteína recombinante Prohibitina;
- Identificar e sintetizar epitopos específicos de linfócitos B da proteína utilizando, para tal, algoritmos e programas de bioinformática disponíveis na internet para a seleção físico-química e predição das sequências de aminoácidos de interesse;
- Avaliar a reatividade dos anticorpos provenientes das amostras de soros de cães com LV sintomática e assintomática, de soros de cães saudáveis e residentes em áreas endêmicas ou não endêmicas de LV; de soros de animais imunizados com a vacina Leish-Tec® e soros de cães infectados por outros parasitos, tais como *Trypanosoma cruzi* e *Ehrlichia canis*; frente à proteína recombinante Prohibitina e ao seu peptídeo sintético, para o sorodiagnóstico da LVC;
- Avaliar a reatividade dos anticorpos provenientes das amostras de soros de pacientes infectados apresentando um estado de LT sintomática, tanto na forma cutânea (LC) como na forma mucosa (LM); de indivíduos saudáveis residentes em uma área endêmica de LT; bem como amostras de soros de indivíduos infectados com Doença de Chagas; para o sorodiagnóstico da LT;
- Avaliar os parâmetros de sensibilidade e especificidade obtidos frente a proteína recombinante Prohibitina e ao peptídeo sintético.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Princípios de Helsínquia e todos os pacientes receberam uma cópia individual da política de estudo, que foi revista por uma pessoa independente. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG), com o número de processo CAAE–323431.14.9.0000.5149. O comprovante e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) são apresentados nos anexos 2 e 3. Com relação à pesquisa usando cães, os soros no estudo fazem parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA / UFOP), sob o número de protocolo 52/2014 (ANEXO 1) em colaboração com o professor Dr. Bruno Mendes Roatt.

4.2. Delineamento do projeto

No presente estudo, propomos a avaliação da proteína Prohibitina em sua forma recombinante e de seu peptídeo sintético no diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar e da leishmaniose visceral canina. Primeiramente, Prohibitina foi identificada em um estudo de imunoproteômica recente, no qual foi reconhecida em extrato de amastigotas de *Leishmania infantum* por anticorpos de cães com LV, demonstrando antigenicidade. A partir disso, o gene da proteína Prohibitina foi clonado, expressado e purificado. Posteriormente foi feita a predição de epítomos de células B, por bioinformática, e síntese dos peptídeos sintéticos; finalmente os ensaios sorológicos utilizando a proteína recombinante Prohibitina e seu peptídeo sintético, além dos extratos solúveis de *Leishmania*, como antígenos comparativos, foram realizados frente a um painel sorológico canino e humano. A partir desses ensaios, os parâmetros diagnósticos de cada antígeno foram analisados estatisticamente.

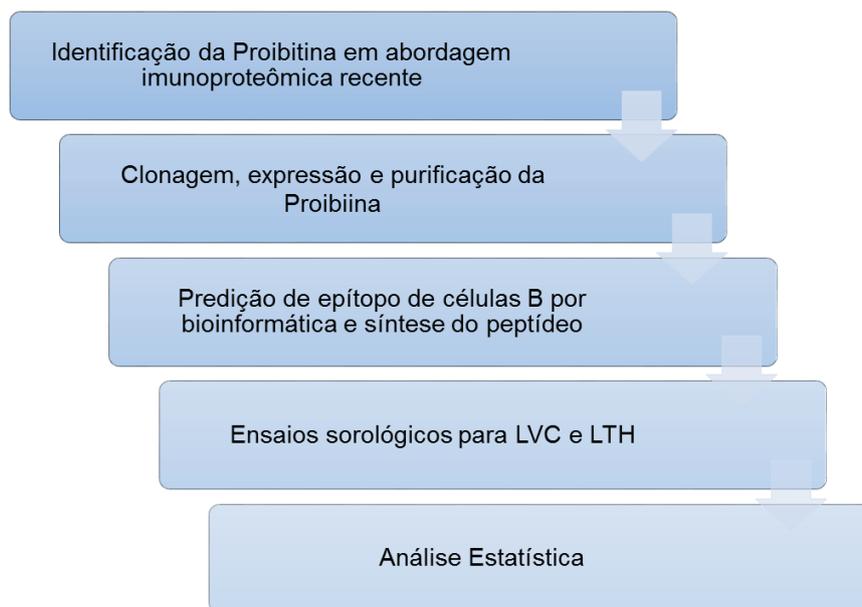


Figura 4. Fluxograma da sequência de experimentos realizada no projeto.

4 3. Amostras de soros caninos

Para a avaliação da antigenicidade da proteína *r*Proibitina, foram utilizadas 301 amostras de soro de cães (*Canis familiaris*), compostas por machos (n=151) e fêmeas (n=150) de diferentes raças e idades. Os soros positivos para LVC foram selecionados com base em dois testes sorológicos da Biomanguinhos (Fiocruz, Brasil): IFAT (IFAT-LVC Bio-Manguinhos kit) e ELISA (EIE- LVC Bio-Manguinhos kit) e pelo teste de PCR. Soros com título < 1/40 no IFAT e identificados abaixo do valor do ponto de corte indicado pelo fabricante foram considerados negativos. Animais com título de IFAT > 1/40 e valor de absorvância acima do ponto de corte foram considerados positivos. Os animais com LV sintomática (LVCS) (n=71) foram positivos nos testes IFAT, ELISA e PCR, e apresentaram três ou mais sinais clínicos da doença, como perda de peso, alopecia, adenopatia, onicogrifose, hepatomegalia, conjuntivite e dermatite esfoliativa no focinho, cauda ou pontas das orelhas. Animais assintomáticos (LVCA) (n=14) também apresentaram resultados parasitológicos e sorológicos positivos, entretanto, não apresentavam sinais clínicos da doença. Soros de animais saudáveis foram selecionados de área endêmica (CSAE) (n=76) (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e não endêmica (CSANE) (n=40) (Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil) para as leishmanioses e apresentaram resultados sorológicos, moleculares e clínicos negativos. Amostras de soros de animais saudáveis, mantidos isolados em canil e imunizados com

a vacina Leish-Tec® (CSV) (n=79) e de animais experimentalmente infectados com *T. cruzi* (Tc) (n=11) e *E. canis* (Ec) (n=10) também foram utilizadas nos ensaios.

4 4. Amostras de soros humanos

Para a avaliação da antigenicidade da proteína *r*Prohibitina, foram utilizadas 113 amostras de soro, sendo essas obtidos de indivíduos infectados apresentando um estado de LT sintomática (n = 20 para LC e n = 39 para LMC); de indivíduos saudáveis residentes em uma área endêmica de LT (Controle) (n = 45) (Belo Horizonte); bem como amostras de soros de indivíduos infectados com Doença de Chagas (DC) (n = 09). O diagnóstico de LT foi confirmado quando, além de características epidemiológicas e clínicas, os parasitos foram visualizados em esfregaços corados com Giemsa de biópsias cutâneas (LC) ou mucosas (LM). Essas amostras de pacientes, quando submetidas a PCR, apresentaram resultados positivos para kDNA de *L. braziliensis*. Além disso, nenhum destes pacientes foi tratado com medicamentos antileishmaniais. Os indivíduos saudáveis não apresentaram nenhum sinal clínico ou sintoma de leishmaniose. A infecção da Doença de Chagas (com *T. cruzi*) foi confirmada pela hemocultura e usando o recombinante Chagatest® kit ELISA recombinante v.4.0 (Wiener lab), bem como o Chagatest® hemagglutination inhibition (Wiener lab).

4 5. Parasitos

A obtenção dos extratos solúveis de *Leishmania* (SLA) de *L. infantum* (SLALi) e *L. braziliensis* (SLALb) foi feita a partir de cerca de 2×10^8 promastigotas/mL, durante a sua fase log. Os parasitos foram centrifugados à 4,000 x g, lavados três vezes com adição de 5 mL de Tampão Fosfato Salino (PBS) estéril. Após cinco ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, a suspensão celular foi centrifugada com uma força de $8,000 \times g$ por 20 minutos à 4°C e alíquotas foram etiquetadas e estocadas em freezer a - 80 °C (COELHO *et al.*, 2003). Uma estimativa da concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando o kit Protein Assay Reagent (Thermo Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante.

4 6. Obtenção e análise das sequências da proteína

A análise *in silico* da sequência da proteína Prohibitina de *L. infantum* (XP_001468827) consistiu na procura de semelhança entre sequências depositadas, através da ferramenta de bioinformática BLAST em bancos de dados de proteínas não redundantes e em comparação com bancos de dados de outras espécies de *Leishmania*, cujos genomas foram sequenciados ou estão na fase de anotação, sendo eles: *L. major* (XP_003722404), *L. donovani* (XP_003864600), *L. braziliensis* (XP_001568126), *L. guyanensis* (CCM18788) (todos disponíveis em www.genedb.org). O programa de alinhamento múltiplo baseado em Cobalt (Constraint-based Multiple Alignment Tool) disponível em (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>) foi utilizado para o alinhamento e a análise das sequências. Partindo da sequência gênica codificadora da proteína, um par de iniciadores foi desenhado para permitir a amplificação do gene de interesse, por meio da técnica de PCR. Os primers Forward e Reverse (Eurofins mwg/operon), descritos abaixo, foram desenhados de acordo com a sequência da região ORF do DNA genômico para *L. infantum*, sendo eles: F → (5'-GCTAGCATGGCGGCCGAGGCGCGGAA - 3') R → (5'-AAGCTTTTACTTCGCCCGGAATG -3'). Um epítipo de células B predito conformacional, presente na proteína Prohibitina foi sintetizado. O peptídeo contendo a sequência: YNRTYGETLRDHGNGRYY foi predito utilizando uma combinação de resultados de três algoritmos: ABCpred Prediction Server (SAHA; RAGHAVA, 2006); o algoritmo de escala de acessibilidade Emini, como descrito por Emini *et al.* (1985) e; Epitopia, como descrito por Rubinstein *et al.* (2009). O peptídeo contém uma combinação de aminoácidos de duas regiões proteicas diferentes da proteína: YNRTYGE (58-64 posições) e TLRDHGNGRYY (261-271 posições). O peptídeo foi sintetizado pela técnica de F-moc (MERRIFIELD, 1963), seguindo modificações descritas por Machado-De-Ávila *et al.* (2011) e, posteriormente, utilizado nos ensaios sorológicos.

4 7. Clonagem do gene da proteína Prohibitina

4.7.1. Extração do DNA genômico dos parasitos

Parasitos das cepas MHOM/BR/1970/BH46 de *Leishmania infantum* e MHOM/BR/1975/M2903 de *L. braziliensis* foram cultivados em meio de cultura

Schneider's (Sigma-Aldrich) completo, constituído por meio Schneider's acrescido com 20% de soro fetal bovino inativado (Sigma), 20 mM de L-glutamina, 200 unidades por mililitro (U/mL) de penicilina e 100 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) de estreptomicina, pH 7,4. Os parasitos foram cultivados a 24°C e repiques das culturas foram efetuados de cinco em cinco dias, período que os parasitos apresentavam-se em fase logarítmica de crescimento. Estoques de parasitos foram mantidos em nitrogênio líquido a -196°C. O DNA genômico foi extraído conforme descrito por Piarroux *et al.* (1993). Para verificar a qualidade e a quantidade do material obtido, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% peso por volume (p/v) (Sigma) em tampão TAE (constituído de Tris 40mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM). O gel foi submetido a uma corrente de 80 volts (V) e corado com brometo de etídio (10 $\mu\text{g/mL}$). A dosagem foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, e a amostra foi armazenada a -80°C.

4.7.2. Amplificação das sequências gênicas por PCR

A região codificadora da proteína foi amplificada por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores complementares ao fragmento, que apresenta cerca de 879 pares de bases (pb).

Sítios de restrição para as enzimas NheI e HindIII foram inseridos na sequência da proteína. Para a reação de amplificação, foi preparado um mix de reação com 10,0 uL da 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega) (5X) (para uma quantidade final de 1x) (Go Taq Buffer (Promega) (5X) possui 7,5 mM de MgCl_2 . A concentração final de MgCl_2 geralmente utilizado em uma reação de PCR é de 1,5 mM); 5,0 uL de dNTP's (2,0 mM) (para uma quantidade final de 0,2 mM); 2,5 uL do primer F (10 μM) (para uma quantidade final de 0,5 μM); 2,5 μL do primer R (10 μM) (para uma quantidade final de 0,5 μM); 0,25 uL da GoTaq® DNA Polymerase (5u/ μl) (para uma quantidade final de 1,25 U); 1,0 uL do DNA genômico (100 ng/ μL) (para uma quantidade final de 100 ng); e água ultra-pura qsp para um volume final de reação de 50 uL (28,75 uL de água UP).

A termociclagem foi padronizada em um ciclador térmico (Tonegen Palm, Tonederm), utilizando-se os seguintes parâmetros:

Passo 1 – Desnaturação a 95 °C por 5 min.

Passo 2 – Desnaturação a 95 °C por 30 seg;

Anelamento a 60 °C por 30 seg;

Extensão a 72 °C por 1 min e 30 seg.

} 35 ciclos

Passo 3 – Extensão final a 72 °C por 5 min.

Estocagem 4 °C – indefinido.

Após a reação, o produto da PCR foi aplicado em um gel de agarose 1% a 100 volts em tampão TAE 1X (4,8 g/L Trisbase pH 8,0, 1,14 mL ácido acético glacial e 2 mL EDTA 0,5 M), contendo brometo de etídio (0,3 µg/µL) (Bio-Rad). O produto da PCR foi quantificado utilizando o comprimento de onda 260/280 nm no aparelho NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

Após a separação em gel de agarose, a banda de interesse foi excisada utilizando uma lâmina de bisturi e a mesma foi submetida à purificação do DNA amplificado, utilizando o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band Purification (GE Healthcare) para obtenção do DNA purificado.

4.7.3. Ligação do gene em pGEM®-T Easy Vector Systems

O produto da amplificação do gene Prohibitina foi ligado ao vetor de clonagem pGEM®- 26 T Easy Vector Systems (Promega). Esse plasmídeo contém um gene de resistência à ampicilina e β-galactosidase, além de sítios para enzimas de restrição. Para cada reação de ligação, foi preparado um mix contendo 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µL de p-GEM-T Easy Vector e 1 µL de T4 DNA Ligase, adicionado em um tubo contendo 3 µL de produto de PCR purificado. A ligação do inserto ao vetor ocorreu a 4°C, durante um período de tempo de 16 h. Posteriormente, o produto foi armazenado em freezer a -20°C.

4.7.4. Preparo e transformação de bactérias *Escherichia coli* XL1blue

Células competentes *E. coli* XL1blue foram preparadas através da técnica de cloreto de cálcio, segundo Sambrook *et al.* (1989). Para a transformação, 2 µL do produto de ligação (pGEM-Prohibitina) foi adicionado a 50 µL de células competentes

XL1-*Blue* previamente armazenadas a -80°C . O material foi incubado em gelo durante 15 min, seguindo de choque térmico a 42°C por 90 seg e nova incubação em gelo por mais 5 min. Foram adicionados 300 μL de meio de cultura 2XYT estéril no tubo de transformação e procedeu-se à incubação a 37°C por 1 h e 30 min, em constante agitação. Placas constituídas por 20 mL de meio de cultura 2XYT sólido autoclavado (10 gramas (g) de extrato de levedura, 16g de triptona bacteriológica, 5g de NaCl e 15g de ágar bacteriológico, para cada 1L de solução, em pH 7,4) suplementado com 20 μL de ampicilina 100mg/mL, 40 μL de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo (IPTG, 100mM) e 20 μL de 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosideo (X-Gal, 50mg/mL) foram utilizadas para plaquear 250 μL da bactéria transformada, sendo utilizada duas placas para tal, uma delas plaqueada com 50 uL e a outra com 200 uL. As placas foram incubadas a 37°C por período de 16 h e a visualização das colônias isoladas brancas indicaram células recombinantes que apresentaram o plasmídeo com o amplicon inserido. Estas colônias foram submetidas à reação de PCR utilizando 2 pg de iniciadores específicos para a região M13 do vetor e a enzima Taq DNA Polimerase (Pht) para confirmar a presença do amplicon no sítio de clonagem, de acordo com as recomendações técnicas do fabricante.

4.7.5. Extração de DNA Plasmidial

Os clones positivos, obtidos na etapa anterior, foram adicionados a 5 mL de meio de cultura 2XYT líquido contendo 5 mL de ampicilina (EMS) (100mg/mL), e incubadas por 16 horas a 37°C , sob agitação e a 200 rpm. A partir desta cultura foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

O plasmídeo contendo o inserto, assim como o vetor de expressão pQE30, foram submetidos à digestão utilizando-se 5 μg dos mesmos, 15U das endonucleases de restrição NheI e HindIII (Promega), tampão específico para as endonucleases (Promega) e água ultra-pura, para um volume final de 30 uL de reação. A digestão ocorreu a 37°C durante 5 horas e, em seguida, os produtos foram confirmados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e, as respectivas bandas obtidas foram excisadas e purificadas com o kit Invisorb® Fragment CleanUp (Invitex) para nova ligação do inserto no plasmídeo de expressão pQE30.

4.7.6. Sequenciamento do gene

Após a clonagem em vetor pGEM-T[®], a amostra do plasmídeo purificado foi separada para a realização do sequenciamento automático de DNA de alta qualidade e para a confirmação das identidades do inserto Prohibitina e do vetor (pGEM-T). O sistema utilizado para o sequenciamento foi o *MegaBACE 1000 DNA Sequencing System* (GE Healthcare), no qual as reações de sequenciamento são feitas utilizando o *DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit Cycle Sequencing* e as corridas são realizadas utilizando o *MegaBACE™ Long Read Matrix*. As sequências foram analisadas pelo software *Sequence Analyser versão 3.0*. Os sequenciamentos foram realizados e analisados pelo Núcleo de Análise de Genoma (NAGE), do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG.

```

MAAEARKKMNAYGGFGNIIGMSALVGVGCVSIYALYKSVFFVPGGFRAVK
FNCITGLYNRTYGEANFAIPFLETPVVFDIRNKPIEVPTASGSRDLQTV
NMAVRVLYQPNVENLYHIYRHIGVNYAETVLPSELINEIIRAVIAQFNASD
LLIKRPEVSHRIGVMLAERAKRFNIDITDVSITQMSFGKEYTNAVEAKQV
AQQMAERAKFRVEQAEQEKQAAILLAQGEAEAATLVGNVAVKRNPFAFLELR
GLEAARTIAKTLRDHGNGRYYLSDSLYVNVKDLKIDHSGTK

```

Figura 5. Sequência de aminoácidos da proteína recombinante Prohibitina.

4.7.7. Clonagem do gene em vetor de expressão

O inserto e o vetor pQE30 digeridos foram ligados utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific), de acordo com as recomendações técnicas do fabricante. A concentração do inserto utilizado na reação de ligação foi calculada através da seguinte fórmula, utilizando-se uma razão de 8x1:

$$\text{ng de inserto} = \frac{(\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto em Kb}) \times 8}{(\text{tamanho do vetor em Kb}) \quad 1}$$

As reações de ligação ocorreram a 4°C por 16 h, levando à formação do vetor de expressão pQE30-Prohibitina.

Na etapa de transformação, seguiu-se o mesmo protocolo citado para a transformação das células *XL1blue* por pGEM, porém utilizando células competentes *E. coli* M15, previamente armazenadas a -80°C. As culturas foram plaqueadas em meio de

cultura 2XYT sólido acrescido com os antibióticos canamicina (25µg/mL) e ampicilina (100µg/mL).

Para confirmar a presença dos insertos, os plasmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina e os DNAs das colônias recombinantes foram submetidos a digestão enzimática com as endonucleases específicas, sendo que um novo gel de agarose a 1% foi realizado para a confirmação dos insertos. Alíquotas das bactérias transformadas foram estocadas em glicerol 16%, a -80°C.

4 8. Expressão e Purificação da proteína recombinante

Para o teste de expressão da proteína, foi realizado um experimento piloto utilizando 10 mL de cultura da bactéria transformada. Após a densidade ótica (DO) da cultura alcançar aproximadamente uma leitura de 0,6, em comprimento de onda de 600nm, uma alíquota de 1 mL foi removida, sendo correspondente ao tempo não induzido (T0). A cultura foi induzida com 1 mM de IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Promega) e 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) e 4 h (T4) após a indução, alíquotas de 1 mL foram retiradas para confirmação da expressão em gel SDS-PAGE. A proteína foi expressa em maior concentração após um período de 4 h de indução, em temperatura de 37°C.

Para a purificação em larga escala, a expressão da proteína foi realizada em 2L de cultura. Para a lise das bactérias, os *pellets* foram ressuspensos em 40 mL de tampão de ligação [20mM de uma solução fosfato de sódio, pH 8,0 (77,4 mL de uma solução fosfato dibásico 1 M em 22,6 mL de uma solução fosfato monobásico 1 M), 500mM NaCl, 5mM Imidazol, 1mM β-mercaptoetanol e 8M ureia], submetidos a 6 ciclos de ultrassom (20 seg cada, 90MHz) e centrifugadas a 13.000 rpm durante 20 min a 4°C, sendo que os sobrenadantes foram analisados por SDS-PAGE. A proteína foi então transferida para colunas empacotadas com Níquel, lavadas com tampão de ligação seguido por tampão de lavagem (20mM solução fosfato pH 8,0, 500mM NaCl, 20mM imidazol e 1mM β-mercaptoethanol, 8M Ureia). As eluições foram realizadas em tampão de eluição (20mM solução fosfato, pH 8,0, 500mM NaCl, 500mM imidazol, 1mM β-mercaptoethanol, 8M Ureia) e a proteína foi dialisada frente a PBS1x.

A proteína purificada foi dosada pelo método de BCA e aplicada em gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5%. O peso molecular da proteína, de aproximadamente

32,3 kDa, foi confirmado quando comparado com proteínas presentes no padrão molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Cientific).

4 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As amostras obtidas nos ensaios de expressão e purificação foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-acrilamida 40%. O gel de separação a 12,5% foi preparado utilizando 1,5 M de Tris-HCl pH 8,8, 0,01% de SDS, 0,5% (v/v) de persulfato de amônio e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando 1,5 M de Tris-HCl, pH 6,8. O tampão de amostra (10% de SDS, 0,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1% de azul de Bromofenol, 5% de 2-β-mercaptoetanol e 10% de glicerol) foi acrescentado e as amostras foram pré-aquecidas durante 5 minutos para a desnaturação das proteínas e, posteriormente, aplicadas no gel para a separação eletroforética. A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS, em pH 8,3), sob à voltagem de 80V até a entrada no gel separador e de 100V até o final da corrida eletroforética. O gel foi corado pelo azul brilhante de Comassie (Comassie Blue R250 em etanol a 50% e ácido fosfórico a 10%) e descorado por lavagens sucessivas com solução descorante (ácido acético 10%, metanol 50% e água destilada 40%).

4 10. Western-Blot

Os experimentos de Western-Blot foram realizados para confirmação da proteína, como descrito por Towbin *et al.* (1979), com modificações. Após o preparo do gel SDS-PAGE, 10 µg da proteína foram aplicados e a corrida eletroforética foi realizada a 100 V. A proteína foi transferida do gel para uma membrana de nitrocelulose (NC, poro de 0,2 µm, Sigma) em tampão de transferência (0,192 M glicina, 0,025 M tris e metanol 20%), a 100 V por 1 h e 30 min. A membrana foi bloqueada com PBS-T 1x (PBS 1x, pH 7,4 e Tween 20 a 0,05% v/v), e albumina bovina a 5%, por 1 h, e posteriormente, lavada com PBS-T 1x. A membranas foram incubadas durante 2 h à temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-poly His conjugado à enzima peroxidase (Sigma Aldrich) na diluição 1:5000 em PBS-T 1x (1:10.000). Após realização das lavagens com PBS-T 1x, seguida por PBS 1x, o substrato (cloronaftol 12,5 mg, metanol 4%, diaminobenzidina 25 mg, 20 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20 vol. e PBS

1x para um volume final de 50 mL) foi acrescentado para a revelação da reação. A reação foi interrompida com água destilada e a membrana foi seca em papel de filtro.

4 11.ELISA para Diagnóstico da LVC

Foram realizadas curvas de titulação a fim de determinar as concentrações mais apropriadas dos antígenos e a diluição dos soros para os experimentos. Placas de microtitulação de 96 poços (Falcon®) foram sensibilizadas com *r*Prohibitina (1,0 µg) ou SLA *L. infantum* (0,5 µg), diluídos em 100 µL de tampão de sensibilização (carbonato de sódio 0,1M e bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6). As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas por 1 h a 37°C. Após serem lavadas, as placas foram incubadas com 100µL por poço de soros de cães individuais, em duplicata, tendo sido diluídos a 1:100 em PBS-T. Após incubação por 1 h a 37°C, as placas foram lavadas novamente e 100 µL do anticorpo anti-IgG de cão (Sigma) conjugado à peroxidase foi utilizado em uma diluição de 1:2.500 em PBS-T 1x por 1 h a 37°C. Para o peptídeo, seguiu-se o mesmo protocolo, contudo, a sensibilização do mesmo ocorreu com 10 ug do mesmo diluído em 50 µL de água UP, no *shaker* à 37°C, para secagem do conteúdo no poço, por um período overnight; com uma diluição de soros de cães individuais de 1:250 e do anticorpo anti-IgG de cão (Sigma) conjugado à peroxidase em uma diluição de 1:1000.

As placas foram lavadas e incubadas com 100 µL da solução reveladora [10 mL de tampão citrato-fosfato (Na₂HPO₄ 24 mM e ácido cítrico 17,5 mM para 1 L de água destilada, pH 5,0), 2 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) e 2 µL de H₂O₂] 29 durante 30 min e ao abrigo da luz. A reação de revelação foi parada adicionando-se 25 µL de 2N H₂SO₄ e a leitura ocorreu em comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada). Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as placas.

4 12.ELISA para Diagnóstico da LT

Foram realizadas curvas de titulação a fim de determinar as concentrações mais apropriadas dos antígenos e a diluição dos soros para os experimentos. Placas de microtitulação de 96 poços (Falcon®) foram sensibilizadas com *r*Prohibitina (0,5 µg) ou SLA *L. braziliensis* (1,0 µg), diluídos em 100 µL de tampão de sensibilização (carbonato de sódio 0,1M e bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6). As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas por 1 h a 37°C. Após serem lavadas, as placas foram

incubadas com 100µL por poço de soros humanos, em duplicata, tendo sido diluídos a 1:100 em PBS-T. Após incubação por 1 h a 37°C, as placas foram lavadas novamente e 100 µL do anticorpo anti-IgG de humano (Sigma) conjugado à peroxidase foi utilizado em uma diluição de 1:5.000 em PBS-T 1x por 1 h a 37°C. Para o peptídeo, seguiu-se o mesmo protocolo, contudo, a sensibilização do mesmo ocorreu com 10 ug do mesmo diluído em 50 µL de água UP, no shaker à 37°C, para secagem do conteúdo no poço, por um período overnight; com uma diluição de soros dos indivíduos de 1:50 e do anticorpo anti-IgG de humano (Sigma) conjugado à peroxidase em uma diluição de 1:5000.

As placas foram lavadas e incubadas com 100 µL da solução reveladora [10 mL de tampão citrato-fosfato (Na_2HPO_4 24 mM e ácido cítrico 17,5 mM para 1 L de água destilada, pH 5,0), 2 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) e 2 µL de H_2O_2] 29 durante 30 min e ao abrigo da luz. A reação de revelação foi parada adicionando-se 25 µL de 2N H_2SO_4 e a leitura ocorreu em comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada). Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as placas.

4 13. Análise Estatística

Os resultados foram analisados usando o GraphPad Prism™ (version 6.0 for Windows) e Winpepi (versão 11.0 para Windows). O valor médio da densidade ótica (DO) foi calculado subtraindo a DO do branco com a DO de cada amostra de soro, usando os valores obtidos nos ensaios de ELISA. Além disso, valores *outlier* foram avaliados utilizando o teste de ROUT e foram excluídos da análise estatística. Foi estabelecido o limite inferior de positividade (*cut-off*) para os antígenos com sensibilidade e especificidade ideal, usando a confecção das curvas ROC (*Receiver Operator Curve*). A acurácia foi avaliada de acordo com a área sobre a curva (*AUC*), em relação às curvas ROC; considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%. As curvas ROC foram plotadas com os valores das amostras de soro dos com LVC sintomáticos ou LVC assintomáticos versus aqueles do grupo controle (cães saudáveis de área endêmica e não endêmica de LVC, cães vacinados com Leish-Tec[®], cães com doença de Chagas e cães com erlichiose); assim como para LT, as curvas ROC foram plotadas com os valores das amostras de soro dos indivíduos com LC ou LM versus aqueles do grupo controle (indivíduos saudáveis e pacientes com doença de Chagas), de

acordo com um método de classificação “doente/não-doente”. Além disso, foi utilizado o teste t de Student não-pareado para comparar as diferenças entre os valores dos grupos LVCS e LVCA, com o grupo não infectado e; dos grupos LC e LM, com o grupo não infectado; bem como o teste exato de Fisher para comparar o desempenho diagnóstico nas ELISAs. Na etapa de análise do desempenho das ELISAS, os seguintes parâmetros foram avaliados: sensibilidade (Se), especificidade (Es), *AUC* e acurácia (AC). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Análise das Sequências em Bancos de Dados

No presente estudo, a proteína Prohibitina se mostrou altamente conservada entre as espécies de *Leishmania sp.* analisadas, com índices de similaridade de 99% com *L. major* (XP_003722404) e *L. donovani* (XP_003864600) e; 98% com *L. braziliensis* (XP_001568126), *L. guyanensis* (CCM18788). Além disso, o epítipo conformacional de células B da proteína foi encontrado em todas as proteínas das diferentes espécies analisadas, o que também reforça seu potencial como candidato a diagnóstico tanto para a LT, como para a LVC, conforme a proposta do trabalho (Figura 6).

<i>L. infantum</i> (XP_001468827)	1	MAAEARKKMNA YGGFGH I I GMSALVGVGCVS IYALYKSI FVPPGGFRAVKFN C I T G I YNRTYGE SANFAI 70
<i>L. donovani</i> (XP_003864600)	1	MAAEARKKMNA YGGFGH I I GMSALVGVGCVS IYALYKSI FVPPGGFRAVKFN C I T G I YNRTYGE SANFAI 70
<i>L. major</i> (XP_003722404)	1	MAAEARKKMNA YGGFGH I I GMSALVGVGCVS IYALYKSI FVPPGGFRAVKFN C I T G I YNRTYGE SANFAI 70
<i>L. braziliensis</i> (XP_001568126)	1	MAAEARKKMNA YGGFGH I V GMSALVGVGCVS IYALYKSI FVPPGGFRAVKFN S I T G I YNRTYGE SANFAI 70
<i>L. guyanensis</i> (CCM18788)	1	MAAEARKKMNA YGGFGH I V GMSALVGVGCVS IYALYKSI FVPPGGFRAVKFN S I T G I YNRTYGE SANFAI 83
<i>L. infantum</i> (XP_001468827)	71	P F L E T P V V F D I R N K P I E V P T A S G S R D L Q T V N M A V R V L Y Q P N V E N L Y H I Y R H I G V N Y A E T V L P S L I N E I I R 140
<i>L. donovani</i> (XP_003864600)	71	P F L E T P V V F D I R N K P I E V P T A S G S R D L Q T V N M A V R V L Y Q P N V D N L Y H I Y R H I G V N Y A E T V L P S L I N E I I R 140
<i>L. major</i> (XP_003722404)	71	P F L E T P V V F D I R N K P I E V P T A S G S R D L Q T V N M A V R V L Y Q P N V E N L Y H I Y R H I G V N Y A E T V L P S L I N E I I R 140
<i>L. braziliensis</i> (XP_001568126)	71	P F L E T P V V F D I R N K P I E V P T A S G S R D L Q T V N M A V R V L Y Q P N V E N L H H I Y R H I G I N Y A E T V L P S L I N E I I R 140
<i>L. guyanensis</i> (CCM18788)	84	P F L E T P V V F D I R N K P I E V P T A S G S R D L Q T V N M A V R V L Y Q P N V E N L H H I Y R H I G I N Y A E T V L P S L I N E I I R 153
<i>L. infantum</i> (XP_001468827)	141	A V I A Q F N A S D L L I K R P E V S H R I G V M L A E R A K R F N I D I T D V S I T Q M S F G K E Y T N A V E A K Q V A Q Q M A E R A K F 210
<i>L. donovani</i> (XP_003864600)	141	A V I A Q F N A S D L L I K R P E V S H R I G V M L A E R A K R F N I D I T D V S I T Q M S F G K E Y T N A V E A K Q V A Q Q M A E R A K F 210
<i>L. major</i> (XP_003722404)	141	A V I A Q F N A S D L L I K R P E V S H R I G V M L A E R A K R F N I D I T D V S I T Q M S F G K E Y T N A V E A K Q V A Q Q M A E R A K F 210
<i>L. braziliensis</i> (XP_001568126)	141	A V I A Q F N A S D L L I K R P E V S H R I G V M L A E R A K R F N I D I T D V S I T Q M S F G K E Y T N A V E A K Q V A Q Q M A E R A K F 210
<i>L. guyanensis</i> (CCM18788)	154	A V I A Q F N A S D L L I K R P E V S H R I G V M L A E R A K R F N I D I T D V S I T Q M S F G K E Y T N A V E A K Q V A Q Q M A E R A K F 223
<i>L. infantum</i> (XP_001468827)	211	R V E Q A E Q E K Q A A I L L A Q G E A E A A T L V G N A V K R N P A F L E L R G L E A A R T I A K T L R D H G N G R Y Y L D S D S L Y V N 280
<i>L. donovani</i> (XP_003864600)	211	R V E Q A E Q E K Q A A I L L A Q G E A E A A T L V G N A V K R N P A F L E L R G L E A A R T I A K T L R D H G N G R Y Y L D S D S L Y V N 280
<i>L. major</i> (XP_003722404)	211	R V E Q A E Q E K Q A A I L L A Q G E A E A A T L V G N A V K R N P A F L E L R G L E A A R T I A K T L R D H G N G R Y Y L D S D S L Y V N 280
<i>L. braziliensis</i> (XP_001568126)	211	R V E Q A E Q E K Q A A I L L A Q G E A E A A T L V G N A V K R N P A F L E L R G L E A A R T I A K T L R D H G N G R Y Y L D S D S L Y V N 280
<i>L. guyanensis</i> (CCM18788)	224	R V E Q A E Q E K Q A A I L L A Q G E A E A A T L V G N A V K R N P A F L E L R G L E A A R T I A K T L R D H G N G R Y Y L D S D S L Y V N 293
		Similarity
<i>L. infantum</i> (XP_001468827)	281	V K D L K I D H S G A K 292 100%
<i>L. donovani</i> (XP_003864600)	281	V K D L K I D H S G A K 292 99%
<i>L. major</i> (XP_003722404)	281	V K D L K I D H S G T K 292 99%
<i>L. braziliensis</i> (XP_001568126)	281	V K D L K I D H S G T K 292 98%
<i>L. guyanensis</i> (CCM18788)	294	V K D L K I D H S G T K 305 98%

Figura 6. Análise da sequência de aminoácidos da Prohibitina expressa em diferentes espécies de *Leishmania spp.* As caixas vermelhas indicam epítipos preditos de linfócitos B na proteína.

A análise *in silico* da sequência da Prohibitina de *L. infantum* (XP_001468827.1) foi realizada usando a ferramenta BLAST, na qual uma busca por similaridade entre as sequências depositadas em bases de dados de proteínas não redundantes foi realizada em comparação com os bancos de dados das espécies de *Leishmania*: *L. major* (XP_003722404), *L. donovani* (XP_003864600), *L. braziliensis* (XP_001568126) e *L. guyanensis* (CCM18788). As sequências de aminoácidos foram alinhadas e o programa Cobalt (Constraint-based Multiple Alignment Tool) foi utilizado para a análise. Os resíduos distintos são evidenciados pela cor vermelha.

5 2. Amplificação do gene de Prohibitina por PCR

A região codificadora da proteína foi amplificada por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores complementares ao fragmento, que apresentou cerca de 879 pares de bases (pb), conforme esperado. (Figura 7).

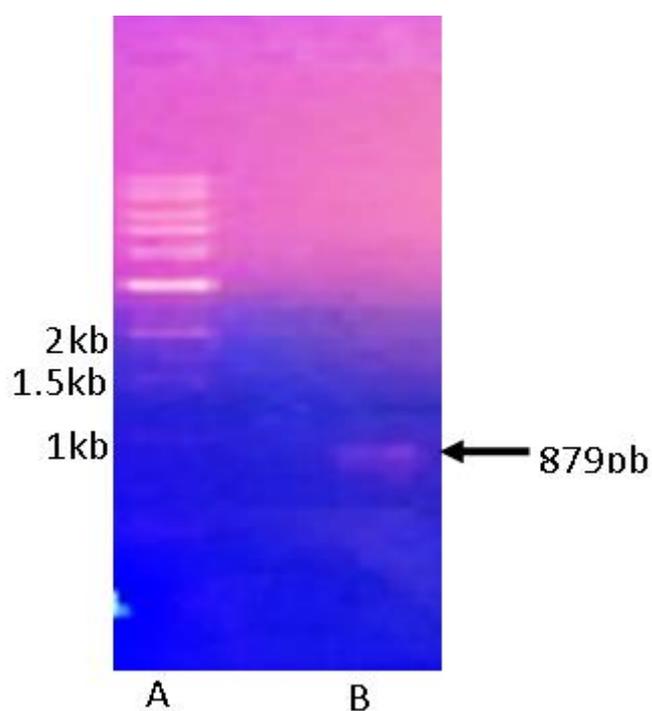


Figura 7. PCR Prohibitina. (A) Padrão molecular (B) Gene da Prohibitina

5 3. Expressão e purificação da proteína recombinante.

A proteína Prohibitina expressa apresentou peso molecular esperado de 32,3 kDa (Figura 8). Em seguida, a fração solúvel do lisado foi purificada utilizando coluna empacotado com níquel, com grau de pureza satisfatório, conforme demonstrado na Figura 8.

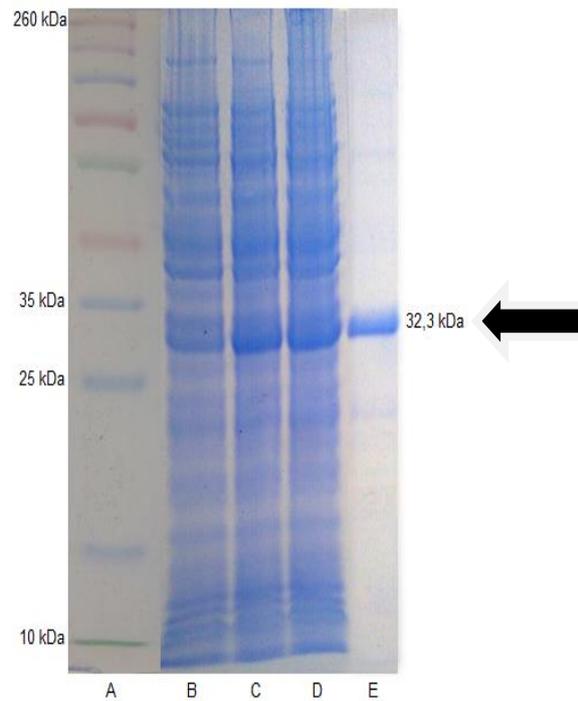


Figura 8. Expressão e purificação da proteína recombinante Prohibitina (*rProhibitina*).

(**A**) Padrão de peso molecular (Spectra™, Thermo Scientific), (**B**) lisado da cultura antes da indução por IPTG (**C**) indução com IPTG por 3 horas, (**D**) indução por IPTG por 4 horas e proteína recombinante Prohibitina após purificação (32,3 KDa) (**E**) por coluna cromatográfica His-Tag.

Para a confirmação da proteína de interesse, realizou-se um Western-Blot com anticorpo monoclonal anti-poly HIS conjugado à peroxidase, revelando a proteína no peso esperado de 32,3 kDa (Figura 9).

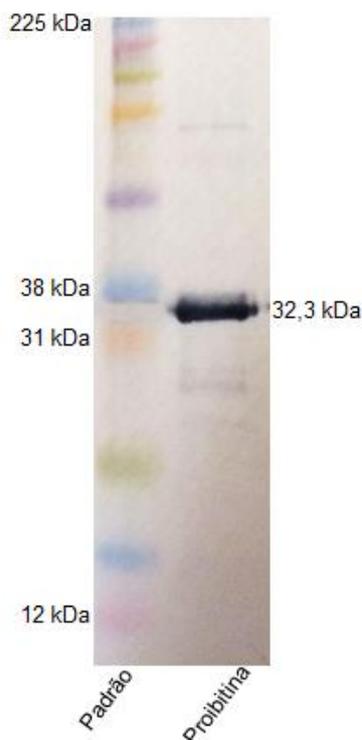


Figura 9. Western-Blot da proteína recombinante Prohibitina (*rProhibitina*)

(A) Padrão de peso molecular (GE Healthcare Life Sciences), (B) proteína recombinante Prohibitina após revelação.

5 4. Proteína Prohibitina (XP_001468827) e peptídeo sintético para o diagnóstico sorológico das leishmanioses

Com objetivo de avaliar a reatividade sorológica de indivíduos portadores de LT e LVC contra *rProhibitina* e o Peptídeo identificado, ensaios de ELISA foram realizados e demonstrados nas Figuras 10 e 11 e Tabela 1.

5.4.1. Desempenho de *rProhibitina* e de seu peptídeo sintético no diagnóstico de leishmaniose visceral canina

Em relação ao diagnóstico sorológico da LVC por de ELISA, a *rProhibitina* e seu peptídeo sintético (Peptídeo) apresentaram melhores valores de sensibilidade e especificidade quando comparado ao SLA *L. infantum* (SLALi). Para os ensaios foram utilizadas amostras de soros de cães saudáveis que vivem em áreas endêmicas (CSAE) ou não endêmicas (CSANE) da doença, soros de cães saudáveis vacinados com Leish-Tec® (CSV) e soros de cães infectados com *Ehrlichia canis* (Ec) e *Trypanosoma cruzi* (Tc). Os dados são apresentados na Figura 10. Os resultados para cada parâmetro

(sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e acurácia) estão resumidos na Tabela 1. A *r*Prohibitina e seu peptídeo sintético apresentaram uma elevada sensibilidade para detectar cães com LV, na forma sintomática e assintomática da doença (91,76% e 83,5% respectivamente), em contraste com o antígeno comparativo SLALi, (48,24%). A *r*Prohibitina e seu peptídeo sintético demonstraram especificidade de 89,81% e 86,86%, respectivamente e, embora a especificidade obtida utilizando SLALi (86,11%) também tenha sido próxima à obtida por ambos, ainda se manteve menor que dos demais antígenos (*r*Prohibitina e Peptídeo). A área sob a curva (*AUC*) foi utilizada para comparar a eficiência dos diferentes antígenos nos testes diagnósticos. A *r*Prohibitina apresentou o maior valor de *AUC* (0,957), seguida de seu peptídeo sintético (0,921), enquanto o SLA de *L. infantum* apresentou o menor valor (0,526), explicado pela baixa sensibilidade obtida. Os valores de DO das amostras de soros foram determinados e são mostrados (Figura 10). Os *cut-off* para discriminação entre amostras negativas e positivas foram determinados usando as curvas ROC.

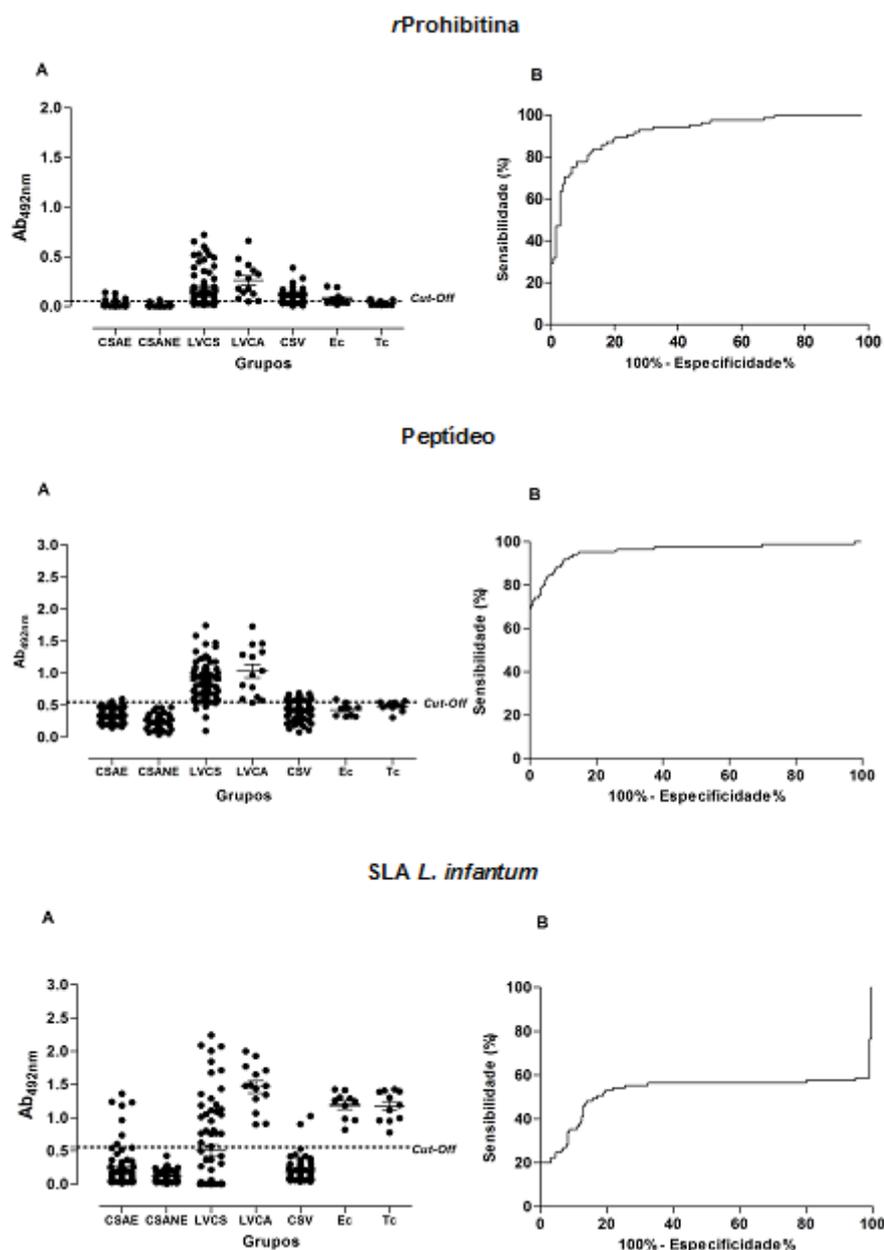


Figura 10. Desempenho diagnóstico da proteína *rProhibitina*, do peptídeo sintético e SLALi para LVC.

Avaliação da reatividade por ELISA frente a soros caninos usando *rProhibitina*, seu peptídeo sintético (Peptídeo) e SLA de *L. infantum* (SLALi) (A). Curvas ROC da *rProhibitina*, Peptídeo e SLALi (B). Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando amostras de soros de cães com LV sintomáticos (LVCS; n=71) e assintomáticos (LVCA; n =14), bem como soros de cães saudáveis que vivem em áreas endêmicas (CSAE; n =76) ou não endêmicas (CSANE; n =40) da leishmaniose, soros de cães saudáveis vacinados com Leish-Tec® (CSV; n =79), soros de cães infectados com *Ehrlichia canis* (Ec; n =10) e soros de cães infectados com *Trypanosoma cruzi* (Tc; n =11). A reatividade frente aos antígenos (A) foi evidenciada. Os *cut-off* para

discriminação de amostras negativas e positivas foram selecionados pela curva ROC, que também é evidenciada (B).

5.4.2. Desempenho diagnóstico da *r*Prohibitina e de seu peptídeo sintético no diagnóstico sorológico da LT

A proteína recombinante Prohibitina e seu peptídeo sintético, foram avaliados no diagnóstico sorológico frente a soros de pacientes com LT, conforme evidenciado na figura 11. O SLA de *L. braziliensis* (SLALb) foi utilizado como um antígeno comparativo. Os resultados para cada parâmetro (sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e acurácia) estão resumidos na Tabela 1. A LT incluiu pacientes com clínica cutânea (LC) e mucosa (LM) da doença. A reatividade cruzada com soro de pacientes chagásicos (DC) também foi avaliada, além da comparação com indivíduos não infectados (Controle). Considerando todas as variáveis analisadas, conforme demonstrado na tabela 1, o peptídeo sintético mostrou elevado desempenho diagnóstico para LT (98,31% de sensibilidade e 100,00% de especificidade), seguido da *r*Prohibitina, que também demonstrou elevada sensibilidade e especificidade (98,31% e 84,91%). As análises da área sob curva (AUC) usando curvas ROC (Figura 10) confirmaram o melhor desempenho do peptídeo sintético (AUC =0,999) e da proteína recombinante *r*Prohibitina (AUC =0,909) em comparação com o SLALb (AUC =0,823), que apresentou 83,05% de sensibilidade e 75,47% de especificidade no diagnóstico de pacientes com manifestações clínicas cutâneas e mucosas da doença. Os valores de DO das amostras de soros foram determinados e são mostrados (Figura 10). Os *cut-off* para discriminação entre amostras negativas e positivas foram determinados usando as curvas ROC.

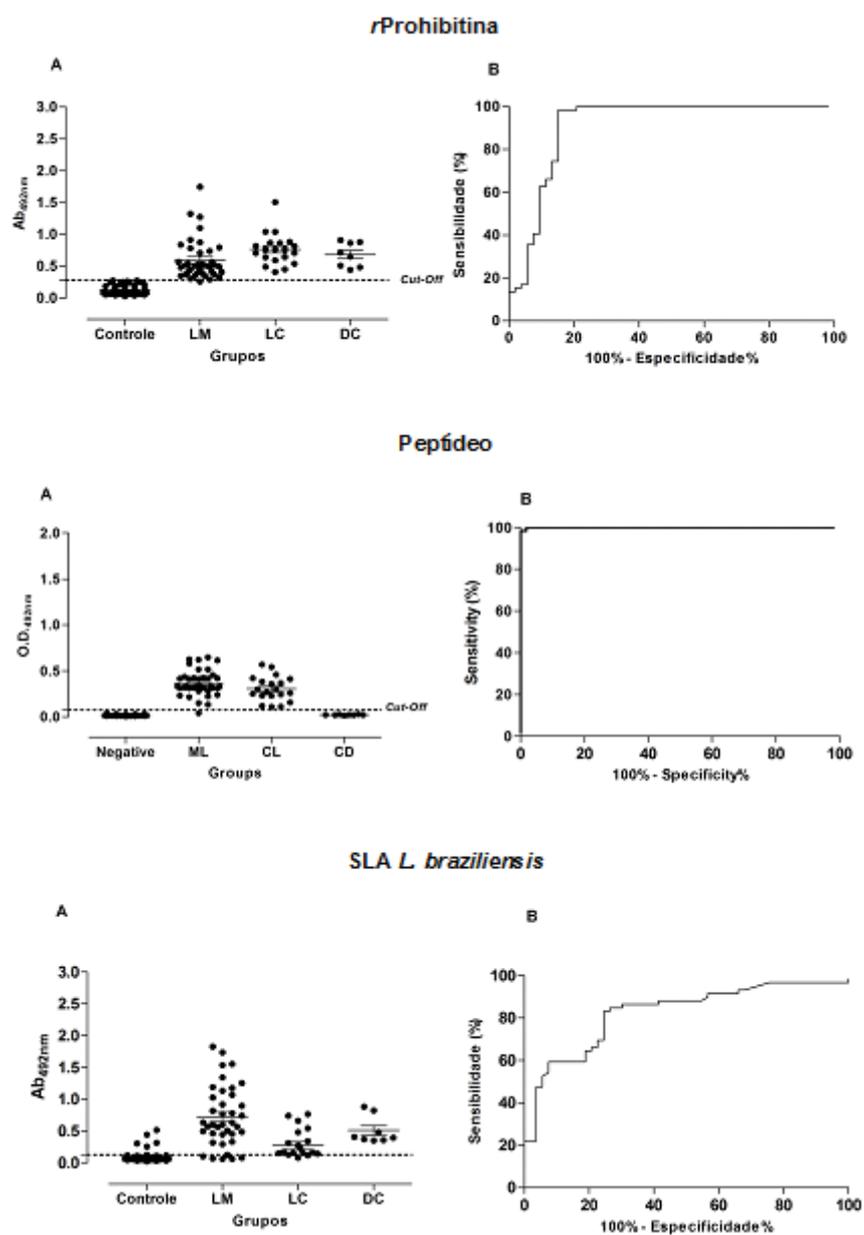


Figura 11. Desempenho diagnóstico da proteína *rProhibitina*, do peptídeo sintético e SLALb para LT.

Avaliação da reatividade por ELISA frente a soros humanos usando *rProhibitina*, Peptídeo e SLA de *L. braziliensis* (A). Curva ROC da *rProhibitina*, Peptídeo e SLA de *L. braziliensis* (B).

Os ensaios ELISA foram realizados utilizando amostras de soros de indivíduos saudáveis que vivem em uma área endêmica de leishmaniose (Controle; n= 45), soros de pacientes com leishmaniose tegumentar sintomática cutânea (LC; n= 20) ou mucocutânea (LM; n= 39), como bem como soro de pacientes chagásicos (DC; n = 09). A reatividade frente aos antígenos (A) foi evidenciada. Os *cut-off* para discriminação de amostras negativas e positivas foram selecionados pela curva ROC que também é evidenciada (B).

Tabela 1. Avaliação do desempenho diagnóstico dos antígenos

Teste	Doença	Parâmetros													
		Cut-off	Se	IC95%	Es	IC95%	AUC	IC95%	VPP (%)	VPN (%)	VP	VN	FP	FN	AC%
Proibitina	LVC	0.5455	91.76	83.77 to 96.62	89.81	84.99 to 93.51	0.9574	0.9272 to 0.9877	78.78	96.53	78	195	21	7	90.67
Peptídeo	LVC	0.0543	83.53	73.91 to 90.69	86.86	63.80 to 76.37	0.9216	0.8852 to 0.9581	46.10	90.48	71	133	83	14	67,77
SLALi	LVC	0.5605	48.24	37.26 to 59.34	86.11	84.45 to 93.13	0.5260	0.4282 to 0.6237	57.75	80.87	41	186	30	44	75,41
Proibitina	LT	0.283	98.31	90.91 to 99.96	84.91	72.41 to 93.25	0.9095	0.8458 to 0.932	98.08	86.67	51	52	1	8	91.96
Peptídeo	LT	0.077	98.31	90.91 to 99.96	100.0	93.28 to 100.0	0.9997	0.9986 to 1.001	100.00	98.15	58	53	0	1	99.12
SLALb	LT	0.1270	83.05	71.03 to 91.56	75.47	61.72 to 86.24	0.8235	0.7448 to 0.9021	79.03	80.00	49	40	13	10	79.46

Os parâmetros foram calculados utilizando todas as amostras apresentadas neste trabalho de LT (Controle + LC + LMC + DC n = 112) e LVC (LVCS + LVCA + CSAE + CSANE + CSV + Ec + Tc n = 301)

Os *Cut-offs* foi obtido através da Curva ROC

Siglas: Se: sensibilidade; Es: especificidade; AUC: área sob a curva; IC: intervalo de confiança; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; VP: verdadeiros positivos; VN: verdadeiros negativos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos; AC: acurácia

Os parâmetros foram calculados utilizando todas as amostras apresentadas neste trabalho de LT (Controle + LC + LM + DC n = 113) e LVC (LVCS + LVCA + CSAE + CSANE + CSV + Ec + Tc n = 301). Os *Cut-off* foram obtidos através da Curva ROC. Abreviações: Se: sensibilidade; Es: especificidade; AUC: área sob a curva; IC: intervalo de confiança; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; VP: verdadeiros positivos; VN: verdadeiros negativos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos; AC: acurácia.

6 DISCUSSÃO

Um diagnóstico precoce e preciso das leishmanioses é de suma importância para a triagem de casos em áreas endêmicas das doenças, administração de um tratamento eficaz, e, conseqüente interrupção do ciclo de vida do parasito (MAGALHÃES *et al.*, 2017).

Testes de diagnóstico confiáveis para a detecção de LVC são essenciais para prevenir a transmissão da doença e o sacrifício desnecessário de cães. Dada a frequência de infecções assintomáticas em cães, visto que, em áreas endêmicas, até 85% dos cães infectados podem ser assintomáticos e servir de reservatório para vetores continuarem a transmissão da doença para outros animais susceptíveis e seres humanos; a dificuldade de detecção direta do parasito e as limitações dos métodos diagnósticos atualmente disponíveis e padronizados, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos e precisos para infecção canina é essencial para programas de vigilância e controle da doença (DANTAS-TORRES; DE BRITO; BRANDÃO FILHO *et al.*, 2006; MICHALSKY *et al.*, 2007.).

Atualmente, não há um teste que seja considerado padrão-ouro para diagnosticar a LT, sendo necessária uma combinação entre exames clínicos, parasitológicos e imunológicos para obter um diagnóstico mais preciso (DAVID; CRAFT, 2009; GOMES *et al.*, 2014). O diagnóstico sorológico de LT é limitado devido à baixa sensibilidade e especificidade variável dos testes atuais, tornando a identificação de antígenos específicos e imunogênicos de importância crucial, principalmente para um diagnóstico precoce da doença, que pode orientar o manejo e o tratamento adequado, evitando assim sequelas permanentes dos pacientes (LIMA *et al.*, 2017; SATO *et al.*, 2017). Geralmente, proteínas altamente abundantes ativam células B e células T-helper, resultando em produção de anticorpos e, portanto, constituem candidatos potenciais para serem usados como antígenos em testes sorológicos para essa doença (LIMA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm sido realizados na busca por novos alvos para o diagnóstico das leishmanioses. Estudos de proteoma têm contribuído para a identificação de novos antígenos que possuem aplicação no imunodiagnóstico e em desenvolvimento de vacinas para as leishmanioses (COELHO *et al.*, 2012; DUARTE *et al.*, 2015). Além disso, estudos que permitem a mapeamento de epitopos antigênicos de

proteínas de microrganismos patogênicos também têm permitido uma maior identificação do número de epítomos-alvo melhorando assim a antigenicidade dos peptídeos (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014). Nesse estudo, a proteína Prohibitina, conservada em *Leishmania*, previamente identificada em estudos de proteoma, foi clonada para ser avaliada no diagnóstico sorológico das leishmanioses. Além disso, realizou-se um estudo da predição de epítomos dessa proteína, sendo sintetizado um peptídeo conformacional com regiões conservadas tanto em espécies que provocam a leishmanioses na forma visceral quanto na forma tegumentar.

Os fatores de virulência são componentes do parasito que contribuem para a patogênese de *Leishmania* e que permitem a invasão e estabelecimento da infecção nos hospedeiros, como os glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), glicoproteínas de superfície (GP), lipofosfoglicanos (LPG), proteofosfoglicano (PPG), proteína de membrana de kinetoplastos de 11 kDa (KMP-11) e a proteína pertencente a uma família de proteínas chamadas peroxiredoxinas, a *Tryparedoxin Peroxidase*. Embora o impacto exato desses componentes de *Leishmania* nas manifestações clínicas observadas em hospedeiros de mamíferos ainda não esteja completamente definido, há evidências de que esses componentes modulam as interações entre *Leishmania* e as células imunes do hospedeiro (SILVA-ALMEIDA *et al.*, 2012) e que as proteínas em parasitos associadas à virulência apresentam alta antigenicidade durante a fase de doença ativa, o que sustenta a busca para confirmar seu uso potencial para o diagnóstico e como marcador para monitorar a resposta terapêutica (SANTARÉM *et al.*, 2005; MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2015).

Estudos demonstraram que a Prohibitina é expressa na superfície do parasito, ancorada por GPI, particularmente concentrada no pólo aflagelar, sendo o pólo aflagelar uma região através da qual ocorrem interações hospedeiro-parasito (JAIN *et al.*, 2010). Durante seu ciclo de vida, o parasito sofre importantes mudanças bioquímicas durante a conversão de promastigotas procíclicas, menos infecciosas, para metacíclicas com maior infectividade (metaciclogênese) e é durante esse processo que o mRNA da Prohibitina é regulado positivamente no parasito, o que faz com que a essa proteína esteja relacionada nas interações hospedeiro-parasito (JAIN *et al.*, 2010). Em um estudo recente de imunoproteômica utilizando soro de cães sintomáticos e assintomáticos, identificaram a Prohibitina expressa somente nos extratos totais do estágio amastigota-like do parasito *L. infantum*, (COELHO *et al.*, 2012). Além disso, essa proteína foi avaliada em estudo como alvo vacinal contra a leishmaniose visceral e para o

diagnóstico sorológico da LVC e LV, demonstrando eficácia protetora contra *L. infantum* e elevada sensibilidade e especificidade nos testes de ELISA (DIAS *et al.*, 2017). Esses achados em conjunto são de suma importância para uma melhor compreensão dessa proteína, além de sugerir que a Prohibitina apresenta potencial para ser avaliada para o diagnóstico das leishmanioses.

Testes sorológicos aplicados para o diagnóstico das leishmanioses são baseados em parâmetros como sensibilidade, especificidade, viabilidade, aplicabilidade de campo e custo (CARVALHO *et al.*, 2017). A técnica de ELISA foi escolhida para esta avaliação, uma vez que demonstrou inúmeras vantagens das quais deve se basear a escolha de um teste sorológico, como: a fácil execução; o baixo custo, visto que seu custo equivale a quase menos da metade do valor do teste atualmente empregado para triagem de cães com LV, o DPP® e; a ausência de necessidade de laboratórios com infraestrutura laboriosa, fatores esses que facilitam seu emprego em larga escala e em campo (COURA-VITAL *et al.*, 2014; EJAZI; ALI, 2013; GRIMALDI *et al.*, 2012; MONDAL, 2010). A junção de todas essas características constitui o ELISA como uma técnica com potencial para ser empregue na busca de novos alvos diagnósticos para as leishmanioses (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014).

Um aspecto importante dos métodos sorológicos aplicados ao diagnóstico das leishmanioses é a escolha do antígeno, que ainda representa um obstáculo relevante, devido a grande quantidade de reações falso-positivas observadas em indivíduos infectados com outros tripanossomatídeos. Diversos estudos demonstram que o extrato solúvel de *Leishmania*, apresenta múltiplos epítomos comuns com outros tripanossomatídeos, o que gera resultados com reatividade cruzada (BARBOSA-DE-DEUS *et al.*, 2002; MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014). Essa característica também foi observada nesse estudo visto a ocorrência de resultados falsos-positivos frente a soros de cães infectados com *T. cruzi* e *E. canis* e no sorodiagnóstico para LT, em que, frente aos soros de pacientes chagásicos apresentaram reatividade quando testado contra o SLA de *L. braziliensis*. As reações cruzadas entre a leishmaniose e outras doenças parasitárias causadas por determinantes antigênicos comuns impedem diagnósticos específicos de leishmaniose, principalmente em regiões onde essas doenças são endêmicas. A partir disso, têm sido desenvolvidas novas estratégias na tentativa de melhorar a qualidade dos antígenos aplicados para o sorodiagnóstico das leishmanioses. Alguns deles foram direcionados para a caracterização e produção de versões recombinantes de antígenos individuais de parasitos e muitos se mostraram

promissores para o sorodiagnóstico da LT (LINDOSO *et al.*, 2009; ROMERO *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2010) e LVC ((KUBAR; FRAGAKI, 2005; ELMAHALLAWY *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2016; GRIMALDI *et al.*, 2012).

Em nossos resultados, *r*Prohibitina se mostrou altamente conservada entre as espécies de *Leishmania* analisadas, assim como seu peptídeo sintético, que também se encontra conservado em todas as sequências exploradas. Jain *et al.* (2010) também demonstrou alta conservação da proteína de *Leishmania* dentro do gênero e relativa distância com proteínas humanas, onde uma semelhança de 40% foi encontrada. As espécies analisadas nesse estudo que apresentaram similaridade nas sequências da proteína incluem aquelas capazes de causar leishmaniose visceral e também aquelas capazes de causar a leishmaniose tegumentar, o que se baseia, então, o uso da proteína recombinante e de seu peptídeo sintético como marcadores diagnósticos para ambas as formas da doença.

Embora a proteína recombinante e seu peptídeo sintético tenham se mostrado potenciais candidatos diagnósticos para ambas as doenças, eles apresentaram parâmetros diagnósticos diferentes para LT e LVC, o que está de acordo com estudos da literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2011) , visto que a especificidade dos anticorpos de cães ou seres humanos contra *L. infantum* pode variar em diversas condições, além do fato de serem doenças distintas, variações podem ocorrer também pela maneira diferenciada que os hospedeiros vertebrados reagem ao parasito, principalmente no que diz respeito ao reconhecimento e apresentação dos antígenos distintos estudados ao sistema imunológico, seja pela influência do estado clínico da doença na sensibilidade dos testes ou também por diferentes mecanismos de sobrevivência parasitária em cada hospedeiro, tanto no homem como no cão. Além disso, mesmo em pessoas que apresentam o mesmo estado clínico da doença, a especificidade da resposta imune individual improvavelmente acontece de forma idêntica. (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A avaliação rigorosa de soros de outras doenças frente à Prohibitina indicou que a proteína recombinante proporcionou especificidade maior para LT e LVC do que aquela obtida com os extratos solúveis de *Leishmania* (SLA de *L. braziliensis* e SLA de *L. infantum*, respectivamente). Um fator aparente surgiu nos testes sorológicos de LT, quando os soros de pacientes com doença de Chagas foram avaliados, apresentando uma reatividade considerável frente à *r*Prohibitina, embora este seja provavelmente um resultado de reatividade cruzada devido a homologia desse antígeno com *T. cruzi*. Segundo Jain *et al.* (2010), a Prohibitina apresenta uma homologia de 79% com *T.*

cruzi e 76% com *T. brucei*. Independentemente disso, os resultados obtidos com o antígeno *r*Prohibitina são muito promissores, apoiando a avaliação e potencial para uso de rotina no diagnóstico sorológico para ambas as doenças.

Os peptídeos sintéticos demonstraram ser reconhecidos pelos anticorpos presentes nos soros de pacientes que desenvolvem diferentes doenças, podendo ser empregues para seu diagnóstico, assim como alguns desses apresentaram resultados promissores tanto para LT como para LV humana e canina. (CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2013; FLOREZ *et al.*, 2017; LINK *et al.*, 2017; MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014)

Derivados desta linha de investigação, a detecção dos principais determinantes antigênicos dentro dessas proteínas e a construção de peptídeos sintéticos capazes de diagnosticar a doença também são o foco da pesquisa atual. Nossos resultados demonstram que entre os antígenos testados para LVC, a *r*Prohibitina produziu um melhor desempenho (maior sensibilidade e especificidade) em relação ao SLALi e, o peptídeo sintético também foi capaz de distinguir doentes/não doentes com maior sensibilidade do que o antígeno comparativo (SLALi). De forma geral, tanto *r*Prohibitina como seu peptídeo sintético se mostraram sensíveis e específicos no diagnóstico da doença, principalmente quando comparados com SLALi, que obteve uma baixa sensibilidade de teste, entretanto, a baixa acurácia obtida quando empregue o peptídeo compromete seu uso como antígeno único para o diagnóstico de LVC. Já para LT, o peptídeo sintético demonstrou-se um potencial candidato, atingindo elevada sensibilidade e ainda uma especificidade de 100%, o que se traduz em ausência de reatividade cruzada com pacientes chagásicos. Deve ser destacado que os peptídeos são mais estáveis, mais fáceis de produzir e mais baratos do que as proteínas recombinantes e, em geral, o uso de peptídeos sintéticos aumenta a especificidade dos imunoenaios em comparação com antígenos brutos (CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2013; FARIA *et al.*, 2011). Nesse estudo, os resultados observados para o peptídeo conformacional no diagnóstico de LT oferecem uma abordagem alternativa para encontrar novas moléculas antigênicas que podem ser facilmente construídas e reproduzidas para fins de diagnóstico.

Além disso, no sorodiagnóstico da LVC, tanto *r*Prohibitina como seu peptídeo sintético foram capazes de detectar cães com a forma assintomática da doença, o que é um ponto relevante, visto que um dos maiores problemas do DPP® é justamente a sensibilidade comprometida em favor do estadiamento clínico da doença. Os problemas na detecção de cães assintomáticos, que apresentam intenso parasitismo cutâneo, fazem com que esses animais continuem se mantendo como reservatórios da doença para vetores e, conseqüentemente, para outros animais susceptíveis e seres humanos (COURA-VITAL *et al.*, 2014, GRIMALDI *et al.*, 2012). Um estudo recente demonstrou o potencial da *r*Prohibitina no diagnóstico sorológico da LVC e LV, com valores elevados de sensibilidade e especificidade superiores aos observados em nosso trabalho (DIAS *et al.*, 2017). A variação observada entre o sorodiagnóstico da LVC é esperada, visto que o painel sorológico avaliado no presente estudo é maior, e diversificado. Entretanto, estudos adicionais considerando um maior *n* amostral além de avaliar a proteína recombinante frente a outros soros de doenças correlacionadas como *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Babesia canis* deve ser considerado.

Uma alternativa para contornar as limitações apresentadas nesse trabalho seria o desenvolvimento de proteínas quiméricas, contendo as regiões dos antígenos que apresentaram o melhor desempenho nas avaliações sorológicas, visto que alguns estudos nesta área já foram feitos e mostraram uma melhora significativa no desempenho diagnóstico dos testes (BOARINO *et al.*, 2005; FARIA *et al.*, 2015; SOTO *et al.*, 1998.). Além disso, estudos adicionais devem ser realizados para aprofundar e compreender o padrão de expressão, bem como a função biológica que a proteína desempenha no parasito.

Neste contexto, esse estudo deve ser tomado como uma base da capacidade dos antígenos propostos para o sorodiagnóstico da LT e da LVC e pode servir como referência para futuros ensaios adicionais. Devido às limitações apontadas para diagnosticar estas importante doenças negligenciadas, este estudo impulsiona novas possibilidades de usar a proteína *r*Prohibitina e seu epítipo conformacional como possíveis marcadores diagnósticos para as leishmanioses.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a proteína Prohibitina recombinante e seu peptídeo sintético demonstraram-se potenciais biomarcadores para o sorodiagnóstico da LVC e da LT, atingindo elevada sensibilidade e especificidade nos testes diagnósticos realizados.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a proteína recombinante Prohibitina e seu peptídeo sintético frente a outros soros de cães com *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Babesia canis*, que além da Erlichiose e doença de Chagas, que são importantes doenças que podem apresentar reatividade cruzada na LVC, principalmente em áreas endêmicas; que não foi testado nesse experimento.
- Utilizar um número amostral maior para validar os resultados encontrados, incluindo nos testes soros de pacientes com leishmaniose visceral humana.
- Comparar a performance da *r*Prohibitina e do peptídeo sintético em relação a outros métodos diagnósticos disponíveis atualmente, como o DPP-LVC® (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e o ELISA, EIE-LVC® ((Bio-Manguinhos/Fiocruz) para uma maior validação dos antígenos propostos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÁNADES, Daniel R. et al. Immunodominant antigens of *Leishmania chagasi* associated with protection against human visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1687, 2012.
- ABUZAID, Abuzaid A. et al. Cutaneous Leishmaniasis in Saudi Arabia: A Comprehensive Overview. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 10, p. 673-684, 2017.
- ADEL, Amel et al. Evaluation of Immunofluorescence Antibody Test Used for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in the Mediterranean Basin: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0161051, 2016.
- AGALLOU, Maria et al. Identification of immunoreactive *Leishmania infantum* protein antigens to asymptomatic dog sera through combined immunoproteomics and bioinformatics analysis. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149894, 2016.
- ALCOLEA, Pedro J. et al. Proteome profiling of the growth phases of *Leishmania pifanoi* promastigotes in axenic culture reveals differential abundance of immunostimulatory proteins. **Acta tropica**, v. 158, p. 240-247, 2016.
- ALVAR, Jorge et al. Canine leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, Jorge; YACTAYO, Sergio; BERN, Caryn. Leishmaniasis and poverty. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AMORIM, Antonio G. et al. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. **Cell stress & chaperones**, v. 1, n. 3, p. 177, 1996.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.
- BARRAL, Aldina et al. The relevance of characterizing *Leishmania* from cutaneous lesions: a simple approach for isolation. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 579-579, 1987.

- BARBOSA-DE-DEUS, Rosângela et al. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 6, p. 1361-1366, 2002.
- BELO, Vinícius Silva et al. Reliability of techniques used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by the national control program in Brazil: A survey in an area of recent transmission. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 146, p. 10-15, 2017.
- BOARINO, A. et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 5, p. 647-653, 2005.
- BRITO, Maria Edileuza F. et al. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 2, p. 318-321, 2000.
- BURNS, James M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 775-779, 1993.
- CARVALHO, Ana Maria RS et al. An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. **Cellular Immunology**, 2017.
- CELESTE, B. J. et al. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 11, p. 1591-1593, 2004.
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel A. et al. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical 42 proteins identified by an immunoproteomic approach. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 835-841, 2013.
- CHAPPUIS, Francois. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature reviews. Microbiology, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

- COATES, P. J. et al. Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence. **Experimental cell research**, v. 265, n. 2, p. 262-273, 2001.
- COELHO, E.A.F et al. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection and Immunity**. v. 71, n. 7, p. 3988- 94, 2003.
- COELHO, Eduardo Antonio Ferraz et al. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 215, p. 63-71, 2016.
- COELHO, Vinicio TS et al. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, p. e1430, 2012.
- COLMENARES, Maria et al. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. S3-S7, 2002.
- COSTA, Lourena E. et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 1, p. 96-106, 2014.
- COTA, Gláucia Fernandes et al. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 3, p. 570-577, 2013.
- COURA-VITAL, Wendel et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91009, 2014.
- CUERVO, Patricia et al. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 154, n. 1, p. 6-21, 2007.
- CUNNINGHAM, Jane et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. 10, p. 1312-1319, 2012.

- DANTAS-TORRES, Filipe; DE BRITO, Maria Edileuza Felinto; BRANDÃO-FILHO, Sinval Pinto. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 140, n. 1, p. 54-60, 2006.
- DANTAS-TORRES, Filipe et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.
- DAVID, Consuelo V.; CRAFT, Noah. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.
- DE RUITER, C. M. et al. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3147-3155, 2014.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.
- DIAS, Daniel S. et al. Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. **Cellular Immunology**, 2017.
- DIAS, SUZANA DE SOUZA et al. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 2, p. 126-132, 2005.
- DUARTE, Mariana C. et al. Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 11, p. 1187-1196, 2015.
- EJAZI, Sarfaraz Ahmad; ALI, Nahid. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 1, p. 79-98, 2013.
- EL-AMIN, E. R.; WRIGHT, E. P.; ABDEL RAHMAN, A. M.; KOLKA, A.; LAARMAN, J. J.; PONDMAN, K. W. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, p. 271-274, 1986.
- ELMAHALLAWY, Ehab Kotb et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 08, p. 961-972, 2014.

- EMINI, Emilio A. et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of virology**, v. 55, n. 3, p. 836-839, 1985.
- FARAHMAND, Mahin et al. Comparison of recombinant A2-ELISA with rKE16 dipstick and direct agglutination tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs in Northwestern Iran. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 188-193, 2015.
- FARAHMAND, Mahin et al. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. **Iranian biomedical journal**, v. 20, n. 3, p. 128, 2016.
- FARIA, Angélica R. et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 9, p. e1310, 2011.
- FARIA, Angélica Rosa et al. Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum*-infected dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 1, p. e3429, 2015.
- FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.
- FLOREZ, M. M. et al. Synthetic peptides derived from ribosomal proteins of *Leishmania* spp. in mucocutaneous leishmaniasis: Diagnostic usefulness. **Protein and peptide letters**, 2017.
- GHOSH, Prakash et al. Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 383, 2016.
- GOMES, Ciro Martins et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701-709, 2014.
- GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.
- GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev bras epidemiol**, p. 338-349, 2004.

- GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert review of anti-infective therapy, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.
- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: **Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum**. Sevilla, Spain. p. 7-14. 2002.
- GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.
- GRIMALDI, Gabriel et al. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 6, p. 966-971, 2012.
- HARHAY, Michael O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.
- JAIN, Rohit et al. *Leishmania* cell surface prohibitin: role in host–parasite interaction. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 4, p. 432-452, 2010.
- JOSHI, Bharat et al. A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 312, n. 2, p. 459-466, 2003.
- KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.
- KUBAR, Joanna; FRAGAKI, Konstantina. Recombinant DNA-derived *Leishmania* proteins: from the laboratory to the field. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. 2, p. 107-114, 2005.
- LAURENTI, Márcia Dalastra. Correlation between parasitological and serological diagnosis in canine american visceral leishmaniasis. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.
- LAURENTI, Márcia Dalastra et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary parasitology**, v. 196, n. 3, p. 296-300, 2013.
- LIMA, B. S. S. et al. A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 174-181, 2017.

- LINDOSO, J. A. L. et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 2, p. 311-318, 2009.
- LINK, Juliana Seger et al. Synthetic Peptides as Potential Antigens for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.
- LOPEZ, Martin et al. Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 49, n. 3, p. 348-356, 1993.
- LUNEDO, Sandro N. et al. Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Acta histochemica**, v. 114, n. 3, p. 252-258, 2012.
- MACHADO-DE-ÁVILA, R.A et al. Mimotopes of mutalysin-II from Lachesis muta snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**. v. 32, n.8, p.1640–1646. 2011.
- MAGALHÃES, Franklin B. et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184867, 2017.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.
- MARTINS, Vivian Tamietti et al. Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of Leishmania infantum against visceral Leishmaniasis. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137683, 2015.
- MENDONÇA, Mitzi G. et al. Persistence of Leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, 2004.
- MENEZES-SOUZA, Daniel et al. Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99216, 2014.
- MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.
- MICHALSKY, Érika Monteiro et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary parasitology**, v. 147, n. 1, p. 67-76, 2007.

- MONDAL, Smriti et al. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 8, p. 919-944, 2010.
- NEGRÃO, Fernanda; EBERLIN, Marcos Nogueira; GIORGIO, Selma. Proteomic approaches for drug discovery against tegumentary leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 577-582, 2017.
- NIJTMANS, Leo GJ et al. Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. **The EMBO journal**, v. 19, n. 11, p. 2444-2451, 2000.
- OLIVA, Gaetano et al. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1318-1322, 2006.
- OLIVEIRA, Geraldo GS et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025-1034, 2011.
- PIARROUX, R. et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* v. 49, n. 3, p. 364-9, 1993.
- REIS, Alexandre Barbosa et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1, p. 87-95, 2009.
- REITHINGER, Richard et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- REY-LADINO, Jose A. et al. *Leishmania major*: Molecular Cloning, Sequencing, and Expression of the Heat Shock Protein 60 Gene Reveals Unique Carboxy Terminal Peptide Sequences. **Experimental parasitology**, v. 85, n. 3, p. 249-263, 1997.
- ROMERO, Gustavo Adolfo Sierra et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta tropica**, v. 93, n. 1, p. 49-56, 2005.
- ROMERO, Gustavo AS; BOELAERT, Marleen. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010

- RUBINSTEIN, Nimrod D. et al. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 287, 2009.
- SAHA, Sudipto; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 40-48, 2006.
- SAKKAS, Hercules; GARTZONIKA, Constantina; LEVIDIOTOU, Stamatina. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of vector borne diseases**, v. 53, n. 1, p. 8, 2016.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: Laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press. 1989.
- SANTARÉM, Nuno et al. Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. **Immunology letters**, v. 101, n. 1, p. 18-23, 2005.
- SANTINI, Maria Soledad; SALOMON, Oscar Daniel; ACARDI, Soraya Alejandra et al. *Lutzomyia longipalpis* behavior and control at an urban visceral leishmaniasis focus in 56 Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 52, n. 4, p. 187–191, 2010.
- SATO, Camila Massae et al. Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different *Leishmania* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 2, p. 495-503, 2017.
- SCALONE, A. et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 4, p. 275-285, 2002.
- SCHUBACH, Armando et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 3, p. 911-914, 1998.
- SILVA, D. A. et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary parasitology**, v. 179, n. 1, p. 257-261, 2011.
- SILVA-ALMEIDA, Mariana et al. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 160, 2012.
- SILVEIRA, Fernando T. et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the

- Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 8, p. 529-535, 2010.
- SINGH, Om Prakash; SUNDAR, Shyam. Developments in diagnosis of visceral leishmaniasis in the elimination era. **Journal of parasitology research**, v. 2015, 2015.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1-18, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, Laia et al. Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706-717, 2017.
- SOLCÀ, Manuela et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 184, n. 2, p. 133-140, 2012.
- SOTO, Manuel et al. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 1, p. 58-63, 1998.
- SOUZA, Ana Paula et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66110, 2013.
- SRIVASTAVA, Pankaj et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1-6, 2011.
- SUDARSHAN, Medhavi et al. Quantitative PCR in epidemiology for early detection of visceral leishmaniasis cases in India. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 12, p. e3366, 2014.
- SUNDAR, S. et al. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 2, p. 284-289, 2007.
- TAVARES, Carlos Alberto P.; FERNANDES, Ana Paula; MELO, Maria Norma. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 3, n. 5, p. 657-667, 2003.
- TEIXEIRA NETO, R. G. et al. Relationship of *Leishmania* -specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 248-257, 2010.

- TORRES-GUERRERO, Edoardo et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, 2017.
- TOWBIN, Harry et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.
- TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229-242, 2007.
- VIOL, M. A. et al. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitology research**, v. 111, n. 4, p. 1607-1613, 2012.
- WEIGLE, Kristen A. et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia). **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 601-606, 2002.
- WERNECK, Guilherme L. et al. Effectiveness of insecticide spraying and culling of dogs on the incidence of *Leishmania infantum* infection in humans: a cluster randomized trial in Teresina, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3172, 2014.
- WHO, World Health Organization. Leishmaniasis. 2017. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- WHO, World Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological situation, 2015. Available at: <http://www.who.int/yaws/epidemiology/en/>
- WOODLOCK, Timothy J. et al. Prohibitin expression is increased in phorbol ester-treated chronic leukemic B-lymphocytes. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 27, n. 1, p. 27-34, 2001.

10 ANEXOS

ANEXO 1: Comprovante de aprovação do projeto pelo CEUA da UFOP



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2014/10, intitulado "*Análise multiparamétrica como plataforma de testes de Imunoquimioterápicos para a Leishmaniose Visceral*", que tem como responsável o/a Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 31/03/2017.

Ouro Preto, 30 de junho de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP

ANEXO 2: Comprovante de aprovação do projeto pelo COEP da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

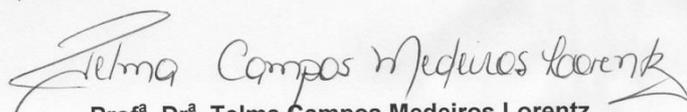
Projeto: CAAE – 32343114.9.0000.5149

Interessado(a): Prof^a. Denise Utsch Gonçalves
Depto. de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Faculdade de Medicina- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de setembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação longitudinal clínica e imunológica de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa da região metropolitana de Belo Horizonte" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


Prof^a. Dr^a. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

PROJETO: “AVALIAÇÃO LONGITUDINAL CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEO-MUCOSA DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS”.

Carta informante

Prezado paciente,

As Leishmanioses são um complexo de doença de afetam grande parte de população e muitas pessoas vivem em área de risco. Ela pode provocar deformações de pele e mucosa. Vários estudos tem demonstrado problemas com o diagnóstico correto e com o tratamento.

Por isso realizaremos uma pesquisa com o objetivo de achar uma substância, no organismo, que auxilie no diagnóstico mais correto e rápido dessa doença, assim como, possíveis substâncias para avaliação da eficácia do tratamento.

Todos que concordarem serão submetidos gratuitamente às avaliações médicas no Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital São Geraldo HC/UFMG em dia e horário agendados. Essas avaliações não oferecem nenhum risco físico nem ao seu tratamento, uma vez que são exames simples realizados comumente. Caso seja detectada alguma alteração nessas avaliações, o(a) Sr(a). receberá o acompanhamento adequado.

Uma amostra de sangue será colhida no momento das consultas. A colheita de sangue não traz nenhum risco para sua saúde. Porém, durante a colheita pode haver dor no local, podendo o mesmo ficar roxo. Não será necessário jejum ou parar os medicamentos que possa estar tomando.

A participação é voluntária, e o(a) Sr(a). poderá desistir de participar a qualquer momento da pesquisa sem a perda de nenhum de seus benefícios. Durante toda a realização da pesquisa, o(a) Sr(a). tem o direito de sanar suas dúvidas sobre os procedimentos a que estará sendo submetido(a). Os dados dessa pesquisa serão analisados e os resultados serão divulgados em revista científica da área de interesse, mas o seu nome sempre estará guardado em sigilo, não aparecendo em nenhum local.

Sendo assim, sua colaboração é fundamental, e desde já, contamos com sua participação.

Atenciosamente,

Denise Utsch Gonçalves – Médica Otorrinolaringologista

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____(nome do responsável), concordo em participar da pesquisa AVALIAÇÃO LONGITUDINAL CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEO-MUCOSA DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS; sabendo que meus dados serão guardados em total sigilo, que serão publicados em revista científica e que poderei deixar de participar do estudo em qualquer momento sem a perda de nenhum de meus benefícios.

Belo Horizonte, _____, de _____2015.

Nome completo e assinatura do participante

Telefones para contato:

Denise Utsch Gonçalves: (31) 33409-9767

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, Campus da Pampulha Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2o andar, sala 2005. Fone: (31) 3409-4592

ANEXO 4: Artigo Submetido

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary
Parasitology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope.

Article Type: Research paper

Keywords: Dogs; Prohibitin; Humans; Leishmaniasis; Recombinant protein; Synthetic peptide; Serodiagnosis

Corresponding Author: Dr. Mariana Duarte, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Federal University of Minas Gerais

First Author: Marcella R Rodrigues, Master

Order of Authors: Marcella R Rodrigues, Master; Lucas S Oliveira, Graduation student; Carolina K Miyasaki, Master student; Vivian M Tamietti, PhD; Ana Maria R Carvalho, Master student; Fernanda Ludolf, PhD; Amanda Christine S Kursancew, Graduation student; Fernanda F Ramos, PhD student; Daniel S Dias, PhD student; Jamil S Oliveira, Graduation; Paula M Vieira, PhD; Bruno M Roatt, PhD; Ricardo A Machado, PhD; Daniel M Souza, PhD; Eduardo F Coelho, PhD; Mariana Duarte, Ph.D

Abstract: In the present study, *Leishmania infantum* Prohibitin was cloned and the recombinant protein (rProhibitin) was evaluated for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. Also, a peptide that showed a high amino acid sequence homology between viscerotropic and cutaneotropic *Leishmania* species was synthesized and evaluated for the serodiagnosis. For the TL diagnosis, this study analyzed serum samples from active cutaneous or mucosal leishmaniasis patients, as well as those from *T. cruzi*-infected patients. For the canine leishmaniasis (CanL) diagnosis, this study examined serum samples of asymptomatic or symptomatic CanL, from non-infected animals living in endemic or non-endemic areas of leishmaniasis, as well as those from Leish-Tec®-vaccinated dogs and *Trypanosoma cruzi* or *Ehrlichia canis* infected animals. In the results, an indirect ELISA method using rProhibitin showed diagnostic sensitivity and specificity values of 91.76% and 89.91%, respectively, for CanL serodiagnosis, and of 98.31% and 84.91%, respectively, for TL diagnosis. The synthetic peptide showed a better result in the TL diagnosis with 98.31% and 100% of sensitivity and specificity. ELISA assays using the recombinant protein and peptide showed better diagnostic properties than soluble *Leishmania* antigen extract. In conclusion, preliminary results suggest that the detection of antibodies against rProhibitin protein and the synthetic peptide, improves the serodiagnosis of tegumentary and canine visceral leishmaniasis.