

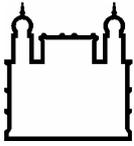
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi*, VISANDO À
PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNODIAGNÓSTICO PARA
LEISHMANIOSE CANINA**

CRISTIANE MARQUES DE SOUZA

RIO DE JANEIRO

2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi*, VISANDO À
PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNODIAGNÓSTICO PARA
LEISHMANIOSE CANINA**

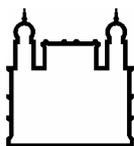
CRISTIANE MARQUES DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Tecnologia
de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2009

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) e no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), sob a orientação dos Prof^{os} Dr. José Godinho da Silva Júnior e Dr. Hilton Jorge Nascimento.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

CRISTIANE MARQUES DE SOUZA

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Leishmania chagasi*, VISANDO À
PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNODIAGNÓSTICO PARA
LEISHMANIOSE CANINA**

Orientadores: Prof^o Dr. José Godinho da Silva Júnior

Prof^o Dr. Hilton Jorge Nascimento

Dissertação aprovada em 15/04/2009.

Examinadores:

**Prof^o Dr. José Procópio Moreno Senna
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ
Presidente**

**Prof^a Dra. Cristiane Dinis Ano Bom
Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Prof^o Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armôa
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ**

Rio de Janeiro
2009

Dedico este trabalho aos meus pais José e Glória,
ao meu marido Leandro e ao meu constante
incentivo: Meu filho Daniel.

AGRADECIMENTOS

A duas pessoas muito atuantes, sem as quais todo este trabalho não seria possível, meus amigos e também orientadores Prof. Dr. José Godinho da Silva Jr. e Dr. Hilton Jorge Nascimento, por contribuírem para a minha formação e meu crescimento profissional.

Ao mestre Edimilson Domingos da Silva, pela incansável disposição e inestimável contribuição na realização deste trabalho.

As amigas, Dra. Ana Paula Ano Bom e Renata Chagas Bastos, igualmente, pelas inúmeras ajudas, pelos desabafos, conselhos, incentivos e valiosos aprendizados.

Ao amigo Michel Sucupira, pela animação e pelos ensinamentos da técnica de *Western Blot*.

Aos colegas do DEREED pela amizade e assistência prestada, a qual foi imprescindível no desenvolvimento deste trabalho.

A todos colegas do LATED, entre eles, Marcelle Bral e Iamare Correa que me acolheram e me ensinaram a técnica do ELISA.

Ao Dr. Marco Medeiros, chefe do LATER, por oferecer o laboratório e a suas funcionárias Dilzamar Veloso, Gabriela Esteves e Natália de Souza pela colaboração e aprendizado.

Ao Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira e sua equipe do CPqGM pelos plasmídeos cedidos, os quais possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos colegas de Mestrado, pelo agradável convívio durante a árdua e proveitosa jornada. Em especial a amiga Aline Zanatta, pela valiosa ajuda com a estatística e pelo constante apoio.

Aos membros da banca de qualificação, Profs. Dr. Procópio Moreno Senna e Dr. Geraldo Armoa, pelas valiosas contribuições na versão final deste trabalho.

A coordenação do MPTI, pelo suporte dado à realização deste mestrado e por ser solícita em todos os momentos, em especial a secretária Zaíra Antunes.

Ao corpo docente do MPTI, pelo estímulo e excelência nas aulas.

Ao Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos e a FIOTEC, pelo apoio logístico e financeiro.

Aos guerreiros José D. Souza e Glória M. Souza, por todo amor, incentivo e respaldo para a realização deste mestrado e aos meus irmãos Alexandre e Adriano M. Souza pelo infinito apoio.

Ao Leandro de Souza Silva, pelo amor, estímulo, ajuda e dedicação em todos os momentos desta jornada.

Ao meu amado anjinho Daniel, por fazer meus dias mais alegres.

A Deus, por simplesmente existir em minha vida, me guiando sempre.

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que de alguma forma contribuíram para viabilizar este trabalho.

O estudo é a essência da sabedoria.

Salomão

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
LISTA DE FIGURA E TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Histórico.....	1
1.2- Epidemiologia.....	3
1.3- <i>Leishmania</i> spp.....	5
1.4- Taxonomia.....	6
1.5- Leishmaniose.....	7
1.6- Transmissão e ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i> spp.....	9
1.7- Reservatório.....	11
1.8- Diagnóstico.....	14
1.9- Busca de novos antígenos.....	17
1.10- Relevância do Estudo.....	21
2 – OBJETIVOS.....	22
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1- Obtenção dos plasmídeos.....	23
3.2- Extração e purificação plasmidial.....	23
3.3- Eletroforese em gel de agarose.....	23
3.4- Transformação bacteriana e expressão das proteínas recombinantes.....	24
3.4.1- Bactéria hospedeira.....	24
3.4.2- Preparo de células competentes.....	24
3.4.3- Transformação bacteriana e preparo de estoques.....	24
3.4.4- Expressão de proteínas.....	25
3.5- Purificação dos antígenos recombinantes.....	25
3.5.1- Purificação da proteína Lc9.....	25
- Lise bacteriana para obtenção da Lc9.....	25
- Purificação por cromatografia de afinidade.....	26
- Purificação por cromatografia de exclusão e peneiração molecular (gel filtração).....	26
3.5.2- Purificação da proteína Lc13.....	27
- Lise bacteriana para obtenção da Lc13.....	27
- Purificação por cromatografia de troca iônica.....	27
3.6- Diálise das amostras.....	27
3.7- Concentração das amostra.....	28
3.8- Quantificação de proteína.....	28
3.9- Análise da homogeneidade protéica.....	28
3.10- Caracterização dos antígenos recombinantes.....	28
3.10.1- Determinação do ponto isoelétrico.....	28
3.10.2- Determinação de peso molecular.....	29
3.10.3- Caracterização imuno-química por <i>Western Blot</i>	29
3.11- Ensaio imunológico.....	30
3.11.1- Obtenção do anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase.....	30
3.11.2- Padronização do ensaio imuno-enzimático (ELISA).....	32
3.11.3- Caracterização de painel.....	33
3.11.4- Critérios de análise.....	33

4 – RESULTADOS	35
4.1- Proteína recombinante de <i>Leishmania chagasi</i> : Lc9.....	35
4.1.1- Eletroforese em gel de agarose	35
4.1.2- Expressão da proteína.....	35
4.1.3- Purificação e análise de homogeneidade da proteína.....	37
4.1.4- Quantificação protéica.....	42
4.1.5- Caracterização físico-química da proteína	43
4.2- Proteína recombinante de <i>Leishmania chagasi</i> : Lc13.....	46
4.2.1- Eletroforese em gel de agarose	46
4.2.2- Expressão de proteína.....	47
4.2.3- Purificação e análise da homogeneidade da proteína.....	48
4.2.4- Quantificação protéica.....	50
4.2.5- Caracterização físico-química da proteína	51
4.3 - Padronização do ensaio imunológico com os antígenos protéicos Lc9 e Lc13	53
4.3.1- Avaliação do anticorpo secundário quanto à concentração de peroxidase e de IgG...	53
4.3.2- Padronização do ensaio imuno-enzimático (ELISA)	54
4.3.3- Determinação da linha de corte (<i>cut-off</i>).....	57
4.3.4- Desempenho do ensaio.....	58
5 – DISCUSSÃO	62
5.1- Expressão e purificação das proteínas.....	63
5.2- Caracterização das proteínas recombinantes.....	65
5.3- Ensaio imunológico (ELISA).....	66
6 - CONCLUSÕES.....	70
7 – PERSPECTIVAS.....	70
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência adquirida

BSA - Albumina do soro bovino

BLAST – *Basic local alignment search tool*

CPqGM/BA - Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz - FIOCRUZ/Salvador-BA

DAT - Teste de aglutinação direta

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade ótica

Cut-Off - Linha de corte (do ELISA)

E - Especificidade

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Ensaio imunoenzimático

FAST - *Fast Agglutination Screening Test*

FP - Falso positivo

FN - Falso negativo

GE - *General Electrics Healthcare*

HPLC - *High Performace Liquid Chromatography* - Cromatografia líquida de alto desempenho

HRP - *Horseradish Peroxidase* - Enzima peroxidase

H₂O₂ - Água oxigenada

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

IEF – Focalização Isoelétrica

IEX – *Ion exchange chromatography* - Cromatografia de troca iônica

IgG – Imunoglobulina G

IMAC - Cromatografia de afinidade por metal imobilizado

IPTG - *Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside* - Isopropiltio-β-D-galactosídeo

IR – Índice de reatividade

Kav – Coeficiente de partição (distribuição) médio

kDNA – Material genético do kinetoplasto presente em *Leishmania sp.*

LB - Luria- Bertani (meio de cultura)

LIT - *Liver Infusion Triptose* (meio de cultura)

LT – Leishmaniose tegumentar

LV- Leishmaniose visceral

LVA - Leishmaniose visceral americana

NaIO₄ – Meta-periodato de sódio

NaBH₃ – Boridreto de sódio

NI-NTA – Resina com afinidade a níquel

NNN - Neal, Novy & Nicolle (meio de cultura)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – Tampão fosfato de Sódio

PBS-T - Tampão fosfato de Sódio com Tween 20

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia

pb – Pares de bases

pI – Ponto Isoelétrico

PM - Peso molecular

PMSF – *Phenyl methyl sulphenyl fluoride* – Fluoreto de fenil metil sulfonil (inibidor de protease)

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

rK39 – Antígeno protéico recombinante de *Leishmania chagasi*

S – Sensibilidade

SDS – *Sodium dodecyl sulphate* - Dodecil sulfato de sódio

SEC – *Size exclusion chromatography* - Cromatografia de exclusão e peneiração molecular

SFM - Sistema fagocítico mononuclear

Th₁- Linfócito T helper responsável pela resposta imune celular

Th₂- Linfócito T helper responsável pela resposta imune humoral

TMB – Tetrametilbenzidina

V₀ – Volume de exclusão (*void*)

V_e – Volume de eluição

VN – Verdadeiro negativo

VP – Verdadeiro positivo

VPN – Valor preditivo negativo

VPP- Valor preditivo positivo

V_t – Volume total da coluna (*bed column*)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1: Mapa das áreas endêmicas para as leishmanioses.....	3
Figura 1.2: Formas promastigotas de <i>Leishmania spp.</i>	6
Figura 1.3: <i>Leishmania sp</i> na forma amastigota.....	6
Figura 1.4: Formas de leishmaniose.....	8
Figura 1.5: Inseto vetor, Flebótomo.....	9
Figura 1.6: Ciclo biológico e modo de transmissão da <i>Leishmania spp.</i>	11
Figura 1.7: Cães infectados por <i>L. chagasi</i>	13
Figura 1.8: Esquema dos plasmídeos.....	19
Figura 3.1: Representação esquemática de um teste de ELISA para a seleção do título do antígeno e do conjugado, com as amostras controles.....	32
Figura 4.1: Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo codificante da proteína Lc9.....	36
Figura 4.2: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida da proteína recombinante Lc9...36	36
Figura 4.3: Cromatografia de afinidade por metal imobilizado da fração solúvel de <i>E.coli</i> submetida a lise celular contendo Lc9.....	37
Figura 4.4: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida das frações eluídas da cromatografia por afinidade da proteína Lc9.....	38
Figura 4.5: Cromatografia de exclusão e peneiração molecular da fração Lc9 isolada da cromatografia de afinidade.....	39
Figura 4.6: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida das frações isoladas da cromatografia de exclusão e peneiração molecular da proteína Lc9.....	40
Figura 4.7: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida da fração solúvel de <i>E.coli</i> submetida a lise celular e frações relacionadas à proteína Lc9.....	41
Figura 4.8: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida da proteína Lc9 purificada	42
Figura 4.9: Eletroforetograma e análise densitométrica da focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida da fração Lc9 purificada por dois processos cromatográficos	43
Figura 4.10: Curva de calibração para determinação de pontos isoelétricos feita a partir da corrida eletroforética de padrões de proteínas de pI conhecidos em gel de poliacrilamida	44
Figura 4.11: Curva de calibração feita a partir da eluição de proteínas padrões de pesos moleculares conhecidos na coluna de exclusão e filtração molecular em Superdex 200.....	45

Figura 4.12: Eletroforese descontínua desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de tricina seguido de imunorevelação após eletrotransferência para membrana de nitrocelulose (<i>Western blot</i>) da proteína Lc9 purificada.....	46
Figura 4.13: Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo linear codificante da proteína Lc13.....	47
Figura 4.14: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, representando o teste de localização da proteína Lc13.....	48
Figura 4.15: Cromatografia de troca aniônica (Poros HQ) dos corpúsculos de inclusão contendo a proteína Lc13 solubilizados com uréia.	49
Figura 4.16: Eletroforese da proteína Lc13 purificada (cromatografia de troca iônica).....	50
Figura 4.17: Focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida da Lc13 purificada.....	51
Figura 4.18: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida tricina seguido de imunorevelação após eletrotransferência para membrana de nitrocelulose (<i>Western blot</i>) da proteína Lc13 purificada.....	52
Figura 4.19: Análise dos valores de absorvâncias frente à amostra de soro de cão controle positivo para leishmaniose reativo a proteína Lc9.....	55
Figura 4.20: Análise dos valores de absorvância frente à amostra de soro de cão controle negativo para leishmaniose com a proteína Lc9.....	55
Figura 4.21: Análise dos valores de absorvância frente à amostra de soro de cão controle positivo para leishmaniose reativo a proteína Lc13.....	56
Figura 4.22: Análise dos valores de absorvância frente à amostra de soro de cão controle negativo para leishmaniose com a proteína Lc13.....	56
Figura 4.23: Análise dos valores de absorvância a 450nm dos soros negativos para leishmaniose canina, usados na obtenção do calculo da linha de corte.....	57
Figura 4.24 – Valores de índice de reatividade, obtidos a partir das densidades óticas a 450 nm das amostras de cães já diagnosticados parasitologicamente, analisadas através do ensaio com proteínas Lc9 e Lc13.....	59
Figura 4.25: Valores estimados para os índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos para o ensaio com a proteína recombinante Lc9.....	60
Figura 4.26: Valores estimados para os índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos para o ensaio com a proteína recombinante Lc13.....	61
Tabela 1.1: Taxa de incidência de leishmaniose visceral (por 100 mil habitantes), por ano e região brasileiras, 1990 a 2005.....	4

Tabela 4.1: Etapas usadas no isolamento da proteína Lc9 e suas concentrações.....	42
Tabela 4.2: Peso molecular estimado da proteína recombinante Lc9.....	45
Tabela 4.3: Etapas usadas no isolamento da proteína Lc13 e suas concentrações.....	50
Tabela 4.4: Valores de absorvâncias determinadas a 403 nm e a 280 nm para os produtos conjugados.....	53
Tabela 4.5: Relação molar (HRP/IgG) obtida para as amostras conjugadas referentes a três concentrações diferentes de NaIO ₄	53
Tabela 4.6: Atividade enzimática do conjugado produzido.....	54

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) causada pelo parasito *Leishmania chagasi* é uma doença severa que ocorre em seres humanos sendo prevalente em vários países, inclusive no Brasil. Trata-se da forma com maior potencial de letalidade. Os cães são importantes reservatórios do parasito, portanto o diagnóstico canino é essencial para os programas de vigilância da LV. Neste trabalho é relatado a expressão, o isolamento e a purificação de dois antígenos recombinantes protéicos de *Leishmania chagasi*, Lc9 e Lc13, produzidos em *Escherichia coli* visando um imuno-ensaio para o diagnóstico desta enfermidade. Inicialmente, os plasmídeos de *E.coli* contendo os gens inseridos e relacionados a ambas as proteínas foram analisados por eletroforese de agarose. A proteína Lc9, por conter um marcador de seis histidinas, foi purificada por cromatografia de metal imobilizado (Ni) seguido por cromatografia de exclusão e peneiração molecular em Superdex 200. A Lc13 foi purificada, somente, por cromatografia de perfusão de troca aniônica em Poros HQ. As preparações protéicas purificadas tiveram suas homogeneidades verificadas por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE), focalização isoelétrica e *western blot*. Um pI estimado de 6,43 e de 6,42 foi observado para Lc9 e Lc13, respectivamente. A determinação de peso molecular (PM) feita por SDS-PAGE-10% indicou valores de 44000 (Lc9) e 88000 (Lc13), enquanto por cromatografia de exclusão e filtração molecular em Superdex 200, os valores estimados foram de 550.000 (Lc9) e 282.000 (Lc13). Estes valores estimados de PM sugerem que ambas macromoléculas apresentam-se em seu estado nativo na forma multimérica, sendo ambas constituídas por cadeias polipeptídicas idênticas. As diferentes detecções protéicas depois do SDS-PAGE de Lc9 e Lc13 purificadas mostraram que a principal banda imunorevelada corresponde a principal banda revelada com o *coomassie brilliant blue* R-350 por igual metodologia. Concluindo-se então que ambas correspondem ao principal antígeno presente em cada uma das duas preparações protéicas (Lc9 e Lc13) purificadas. Para o desenvolvimento de um ELISA indireto, relacionado ao diagnóstico da leishmaniose visceral canina, os antígenos, Lc9 e Lc13 e o conjugado IgG – peroxidase tiveram as faixas de concentrações selecionadas para uso no referido ensaio sorológico. Segundo a mesma metodologia, o antígeno Lc9 apresentou melhores resultados que o antígeno Lc13 (Lc9: sensibilidade 100%; especificidade 95% e Lc13: sensibilidade 96%; especificidade 92%). Os resultados obtidos propõem o uso das proteínas recombinantes Lc9 e Lc13, principalmente a primeira, num imuno-ensaio baseado em ELISA para o aperfeiçoamento do diagnóstico da leishmaniose.

ABSTRACT

The visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania chagasi* is a relevant human disease prevalent in many countries, including Brazil. This form has the greatest potential for lethality. Dogs are important reservoir of the parasite, thus diagnosis of canine infections is essential for VL surveillance programs. This work is related to the expression, isolation and purification of two recombinant protein antigens of *Leishmania chagasi*, Lc9 and Lc13, produced in *Escherichia coli* aiming a diagnostic illness immune assay. Initially, the *E. coli* plasmids containing the inserted genes related to both proteins were analyzed in agarose gel electrophoresis. The protein Lc9 containing a hexapeptide histidine tag was purified by immobilized metal (Ni) affinity chromatography followed by sieving exclusion chromatography in Superdex 200. The Lc13 was only purified by anion exchange perfusion column chromatography onto Poros HQ. The purified protein preparations had their homogeneities ascertained by denaturing gel electrophoresis (SDS-PAGE), isoelectric focusing and *western blot*. Estimated pI of 6.43 and 6.42 were observed for Lc9 and Lc13, respectively. Molecular weights (MW) determined by SDS-PAGE-10% showed values of 44000 (Lc9) and 88000 (Lc13), while values of 550000 (Lc9) and 282000 (Lc13), were obtained by Superdex- 200 gel filtration. These estimated MW values suggested that both macromolecules in native state are multimeric proteins being formed by identical polypeptide chains. Different protein detections after SDS-PAGE of purified Lc9 and Lc13 showed that the major immune-revealed band correspond to the major coomassie brilliant blue R-350 revealed bands. So it concluded that both correspond to the main antigen present in each purified protein preparation (Lc9 and Lc13). For the development of an indirect ELISA for canine visceral leishmaniasis diagnosis the antigens Lc9 and Lc13 as well IgG-peroxidase conjugate suitable concentrations were selected for the use in the related serologic assay. According to mentioned serological assay the antigen Lc9 gave better results than the antigen Lc13 (Lc9: sensitivity 100%; specificity 95% and Lc13: sensitivity 96%; specificity 92%). These results suggest the use of Lc9 and Lc13 antigens, preferably the former, in immune assays based on ELISA for the improvement of the leishmaniasis diagnostic.

1 – INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

A primeira descrição das leishmanioses pode ser atribuída a Russel, que em 1756 relatou um caso de um paciente na Turquia com lesão cutânea única, sugestiva da doença. Em 1885, Cunningham observou a presença de microorganismos em material de biopsia de lesão de um paciente com botão do Oriente, como era chamada a doença no Oriente médio. Em 1903, Leishman, na Índia, identificou o parasito no baço de um paciente. Neste mesmo ano, Ross criou o gênero *Leishmania*, e Wright classificou como *Leishmania tropica* o agente etiológico do botão do Oriente (Donovan, 1903; Grevelink e Lerner, 1996).

Considerando-se a doença no novo mundo (América), admite-se que a leishmaniose tegumentar (LT) seja uma doença autóctone do continente americano. Cerâmicas da era pré-colombiana, datadas de 400-900 a.C cuja fabricação foi atribuída aos huacos, um povo que habitou a região hoje relacionada ao Equador e Peru, comumente, mostram figuras de pessoas apresentando mutilações similares às causadas pela forma mucosa e mucocutânea da doença. Além disso, historiadores espanhóis, já na época do “descobrimento”, relataram o acometimento de lesões faciais em ameríndios locais (Pessoa, 1982).

No Brasil, em 1855, Cerqueira observou a existência de lesões cutâneas, idêntica ao botão-de-Biskra. Na Itália, em 1895, Breda descreveu a doença em italianos que, retornavam de São Paulo. Em 1908, a doença atingiu gravemente o estado de São Paulo, ganhando nomes como: úlcera de Bauru, ferida brava, úlcera do noroeste, entre outras denominações. No entanto, seu agente etiológico era desconhecido, até que, em 1909, Lindenberg noticiou a descoberta do parasito da úlcera de Bauru, que ele identificou como o mesmo agente responsável pelo botão do oriente. Em 1911, Gaspar Vianna propôs o nome de *Leishmania (Leishmania) braziliensis*, para o agente etiológico da leishmaniose do novo mundo, considerando que este, fosse diferente da *Leishmania (Leishmania) tropica*, agente etiológico do botão do Oriente (Pessoa, 1982 e Cimermam, 2002). Em 1923, Rabelo criou o termo leishmaniose tegumentar americana,

denominação que abrange as formas cutâneas e mucosas da doença (Cimermam, 2002; Grevelink e Lerner, 1996).

A forma visceral se confundia no passado com outras doenças endêmicas e de apresentação clínica semelhante, como a malária. Em 1903, Leishman identificou no baço de um soldado inglês que morrera de febre Dum-Dum na Índia, próximo de Calcutá, certos microrganismos que considerou tripanossomas; alguns meses mais tarde, Donovan analisando uma amostra de punção esplênica de uma criança, descreveu-os como novos agentes. As características mais relevantes observadas do microorganismo, nos cortes histológicos, eram o núcleo e uma estrutura em forma de bastão, chamada cinetoplasto. O termo “kala-azar” (febre negra) foi aplicado por médicos indianos a uma velha doença que mais tarde passou a ser denominada como leishmaniose visceral (LV), que se caracterizava por debilidade geral, acessos de febre irregulares e repetitivos, além de anemia severa anemia severa, atrofia muscular, entre outras manifestações clínicas. A relação entre o calazar e o parasito foi estabelecido por Ross em 1903, que o denominou de *Leishmania donovani* (Donovan, 1903; Pessoa, 1982).

Em 1913, Migone diagnosticou no Paraguai o primeiro caso humano autóctone das Américas. Tratava-se de um paciente que havia retornado ao seu país após trabalhar no Brasil na construção da estrada de ferro São Paulo – Corumbá (Lainson e Shaw, 1992 e Cimermam, 2002). No Brasil, o primeiro caso diagnosticado com vida foi relatado por Evandro Chagas, em 1936. No ano seguinte Chagas denominou o parasito de *L.(L.) donovani chagasi*. Nas décadas de 50 e 60 do século passado, estudos clínicos e terapêuticos começaram a ser feitos e o casal Deane mostrou que a doença era uma zoonose (Cimermam, 2002).

Segundo Lainson e Shaw (1992), existem duas hipóteses sobre a origem da leishmaniose visceral americana (LVA). A primeira, sugere que o parasito responsável, a *L. (L.) chagasi*, seja autóctone da América, onde primeiramente, parasitava canídeos selvagens e só mais recentemente, começou a infectar homens e cães domésticos. A segunda hipótese considera que a LVA seja causada pela *L.(L.) infantum* que teria sido trazida para a América, nos tempos pós-colombianos, pelos imigrantes europeus ou por seus cães infectados. O reconhecimento da transmissão da leishmaniose por insetos do gênero *Phlebotomus* foi descrito pela primeira vez em 1905 por Sergent e Sergent (Pessoa, 1982).

A ação curativa do tártaro emético foi descrita em 1912 por Gaspar Vianna e, até hoje, a base desse medicamento é utilizada no tratamento das leishmanioses (Pessoa, 1982). No final dos anos 40, os antimônios pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan ou Pentamidina) e o antimoniato de N-methyl glucamina (Glucantine) começaram a ser empregados,

no combate a esta enfermidade, como também o antibiótico anfotericina B, este no caso, para pacientes com contra-indicação do uso de antimoniais (Rey, 1998).

1.2- Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que as leishmanioses ocorram em 88 países distribuídos em quatro continentes, onde a maior incidência é observada em regiões tropicais e subtropicais (Figura 1.1). Desse total, 90% dos casos ocorrem em oito países: Brasil, Bolívia, Peru, Irã, Índia, Síria, Afeganistão e Arábia Saudita, e em alguns países africanos (WHO, 2006). Dentre os 88 países endêmicos, setenta e dois são considerados países “em desenvolvimento” e treze figuram na lista dos menos desenvolvidos. Cerca de 12 milhões de pessoas no mundo estão infectadas e há um total de 350 milhões de indivíduos sob risco de contrair a infecção, que está classificada pela OMS entre as seis maiores endemias humanas devido a sua alta incidência e capacidade de produzir deformações (Zaverucha, 2005; Gontijo e Carvalho, 2003).

Estima-se que anualmente ocorram 2 milhões de novos casos, embora somente 600.000 sejam relatados oficialmente e que cerca de 60.000 mortes por ano sejam devidas às leishmanioses (WHO, 2006). No sul da Europa a co-infecção com o HIV agrava ainda mais a situação da LV. Neste continente, de 25 a 70% dos casos de LV em adultos, estão relacionados com a infecção por HIV (WHO, 2002). No Brasil, o número de novos casos de LT saltou de 21.800 casos em 1998 para 40.000 casos em 2002 (FUNASA, 2002).

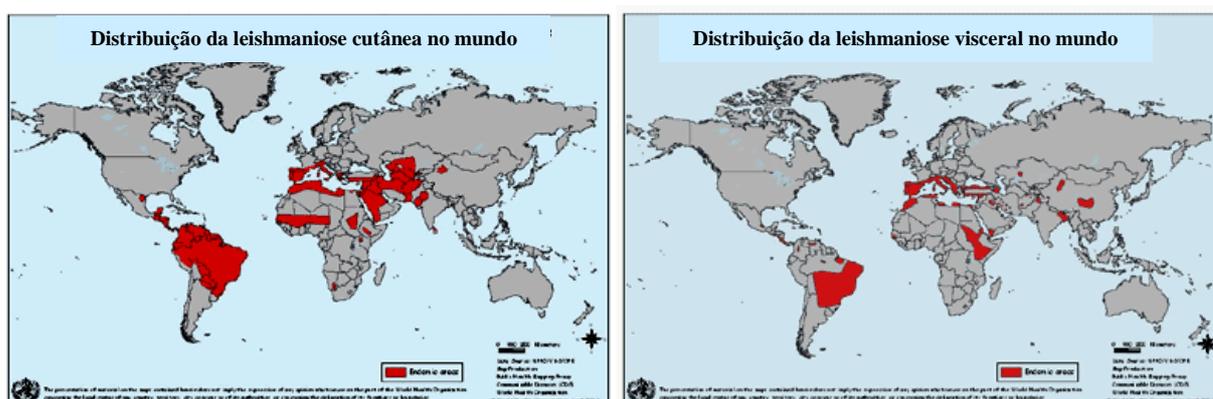


Figura 1.1: Mapa das áreas endêmicas para as leishmanioses. Em vermelho estão as áreas atingidas pela leishmaniose. Fonte: WHO, 2007.

A LV era considerada uma endemia de áreas rurais pobres, muito frequente na região nordeste do Brasil, onde as populações rurais eram as mais atingidas por esta doença. Não obstante, a mesma estivesse em fase de franca urbanização e expansão para outras regiões, incluindo a periferia de alguns centros urbanos até então considerada não endêmicas. A LV, sozinha, promove o aparecimento de aproximadamente 500.000 novos indivíduos doentes por ano em todo o mundo (FUNASA, 2002; Desjeux, 2004; Ministério da Saúde, 2005).

Entre os 27 estados brasileiros, cerca de 19 já registraram casos da doença. No período de 1990 a 2005, a taxa de incidência de LV para o país variou entre 1 a 3 casos por 100 mil habitantes. Os valores são mais elevados para as regiões Norte e Nordeste, mas a doença encontra-se em expansão nas regiões Centro-Oeste e Sudeste e na região Sul um pequeno número de casos começam a surgir (Tabela 1.1). Com relação ao número absoluto de casos, a região Nordeste contribuiu com quase 90% dos casos registrados até o ano de 2000. Essa participação tem se reduzido na década atual, chegando a 56% em 2005 (Ministério da Saúde, 2006).

Tabela 1.1: Taxa de incidência de leishmaniose visceral (por 100 mil habitantes), por ano e por regiões brasileiras, 1990 a 2005.

Regiões	1990	1993	1996	1999	2002	2005
Norte	0,4	0,8	1,2	3,1	2,4	4,2
Nordeste	4	5,5	6,5	6,4	2,9	3,8
Sudeste	0,4	0,1	0,2	0,3	0,6	0,8
Sul	0	0	0	0	0,01	0,01
Centro-Oeste	0,2	0,2	0,1	0,8	1,7	1,9

Fonte: Ministério da saúde/IBGE, 2006.

Alguns acontecimentos são responsáveis pela expansão da doença em grandes cidades brasileiras. Um deles, certamente, é o desmatamento de grandes zonas florestais no perímetro das médias e grandes metrópoles, devido ao crescimento urbano mal planejado. Em decorrência disso, ocorre o deslocamento do agente etiológico e do vetor (flebotomíneo), assim como a aproximação de animais silvestres reservatórios para as cercanias da cidade, contribuindo para a expansão da leishmaniose canina e humana (FUNASA, 1999; Cortada *et al.*, 2004).

Outros fatores de risco que ampliam o problema são a desnutrição, as péssimas condições sanitárias e os serviços inadequados de saúde a disposição de indivíduos pobres (Desjeux, 2004; Zerpa *et al.*, 2003). Outro fator agravante é o hábito de se criar animais domésticos como cães, galinhas e porcos, que, se por um lado, proporciona uma abundância de sangue disponível para os

vetores hematófagos e aumentam dramaticamente a densidade de população vetorial, por outro lado, fornecem hospedeiros mamíferos que servirão como reservatórios para os parasitas (Grimaldi Jr. e Tesh, 1993).

A profilaxia da doença consiste no rompimento da cadeia epidemiológica e as medidas de controle se baseiam na busca ativa de doentes, com encaminhamento para diagnóstico e tratamento, inquérito sorológico canino, apreensão e eliminação dos cães soropositivos, programas de educação comunitária e proteção individual contra a picada dos flebotomos (Soares, 2005). A imunoprofilaxia é uma alternativa para o controle das leishmanioses humana e canina. Várias vacinas foram desenvolvidas e/ou testadas em diversos países, algumas em fase final de análise clínica, mas até o presente, nenhuma foi comprovada ser eficaz ou viável (Ministério da Saúde, 2006; WHO, 2006; Martins *et al.*, 2006).

1.3- *Leishmania* spp

A *Leishmania* é um protozoário, parasito intracelular, do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae e a ordem Kinetoplastida que caracteriza-se por apresentar mitocôndria única, que possui uma porção rica em kDNA (material genético mitocondrial), denominado cinetoplasto (Grimaldi Jr e Tesh, 1993). A *Leishmania* é o agente etiológico de várias enfermidades conhecidas como leishmanioses que acometem humanos, animais silvestres e domésticos das regiões quentes e menos desenvolvidas do velho e do novo mundo. São parasitos heteroxenos, ou seja, possuem dois hospedeiros durante seu ciclo de vida, um invertebrado, no qual o parasito se desenvolve no tubo digestivo e outro vertebrado, que se desenvolvem nos tecidos, principalmente, em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). O parasito apresenta duas formas principais durante seu ciclo vital, a promastigota e amastigota, em função da presença ou não de flagelo exposto (Pessoa, 1982; Marzochi, 1992).

A forma promastigota possui corpo alongado e móvel devido à presença do flagelo livre (Figura 1.2). Apresenta um núcleo situado na porção média do corpo, enquanto o cinetoplasto fica próximo a extremidade anterior, de onde emerge o flagelo, o qual atravessa um estreito canal denominado bolsa flagelar (Rey, 2001). Esta forma é encontrada no intestino médio dos dípteros hematófagos flebotomíneos (hospedeiro invertebrado), multiplicando-se por divisão binária longitudinal. Depois invadem o esôfago e a faringe do flebotomíneo e fixam-se na parede do trato digestivo. Podem também crescer e se multiplicar *in vitro*, em meio de cultura axênico, a 22-25°C (Moraes, 2000). A forma amastigota possui pequenas dimensões, contorno ovóide, corpo

achatado, pouco citoplasma e núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico (Figura 1.3). O cinetoplasto é visível, porém o flagelo é reduzido ao segmento intracelular, contido na bolsa flagelar. É encontrada no interior de células do SFM e se reproduz por divisão binária (Moraes, 2000 ; Rey, 2001).



Figura 1.2: Formas promastigotas de *Leishmania* sp.
Fonte: Souza, 2002.

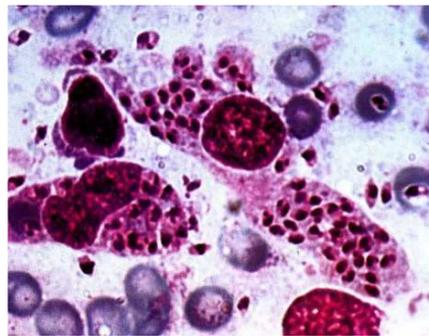


Figura 1.3: *Leishmania* sp na forma amastigota.
Fonte: OMS LEISH 96/40

1.4- Taxonomia

Existe uma enorme dificuldade na classificação das espécies do gênero *Leishmania*, devido à grande semelhança morfológica entre elas. Inicialmente, as espécies foram identificadas em função do aspecto clínico das doenças, assim, Lainson e Shaw reuniram as espécies em três complexos: Complexo *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. donovani*. Atualmente, a classificação das espécies deste gênero baseia-se em características clínicas e epidemiológicas, apoiada por aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares (Souza, 2002).

Posição taxonômica do parasito *Leishmania*, segundo Lainson e Shaw, 1987:

Reino: Protista

Sub-Reino: Protozoa

Filo: Sarcomastigophora

Sub-Filo: Mastigophora

Classe: Zoomastigophorea

Ordem: Kinetoplastida

Sub-Ordem: Trypanosomatina

Família: Trypanosomatidae

Gênero: *Leishmania*

No novo mundo são reconhecidas algumas espécies de *Leishmania* pertencentes a dois subgêneros que marcam, segundo Lainson e Shaw (1987), as diferenças de comportamento dos parasitos no organismo do inseto vetor e o desenvolvimento em meios de cultura. São eles: Subgênero *Viannia*, no qual os parasitos têm desenvolvimento no intestino posterior do inseto vetor e apresentam crescimento pobre em meio de cultura convencional, desenvolvimento lento no hospedeiro vertebrado infectado e o Subgênero *Leishmania*, englobando as espécies que se desenvolvem no intestino anterior dos insetos vetores, que crescem facilmente em cultura e provocam grandes lesões nodulares nos hospedeiros vertebrados (Souza, 2002; Lainson e Shaw, 1992).

As diferentes espécies do gênero *Leishmania* produzem grande variedade de manifestações clínicas que dependem da interação entre a resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, do potencial invasivo, tropismo e patogenicidade do parasito (Souza, 2002).

1.5- Leishmaniose

As leishmanioses formam um conjunto de doenças infecto-parasitárias de evolução crônica que acometem pele e mucosas, no caso da Leishmaniose Tegumentar, ou podem atingir órgãos internos, no caso da Leishmaniose Visceral, sendo potencialmente fatal. A doença é uma zoonose, embora seja considerado que a leishmania realize um ciclo silvestre, outro peridoméstico, ou mesmo doméstico, quando o homem invade o *habitat* silvestre para atividades econômicas ou domésticas, sugerindo uma antroponose. Em todos estes casos há, também, a adaptação do vetor, o flebotomíneo (Marzochi, 1992).

As espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem estão relacionadas a um amplo espectro de formas clínicas, variando desde uma infecção inaparente, passando pela forma mucosa, com caráter desfigurante até a forma visceral (Figura 1.4) (Carvalho *et al*, 1988). Estas manifestações clínicas dependem, entre outros fatores, da espécie causadora da doença e da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro, uma vez que a ação patogênica do parasito está relacionada com a destruição celular provocada pela resposta imunológica (Turk e Bryceson, 1971).

A forma tegumentar divide-se em três formas clínicas: Leishmaniose cutânea, a qual apresenta comprometimento exclusivamente da pele, com lesão ulcerada única ou múltiplas lesões no local da picada (Balanco, 2005); Leishmaniose mucocutânea, caracterizada pelo aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e oro-faringe, sendo uma forma

secundária que pode ocorrer até mesmo anos após a cura de uma lesão cutânea localizada (Zaverucha, 2005) e leishmaniose cutânea difusa, que apresenta formas cutâneas disseminadas com múltiplas lesões não ulceradas em todo o corpo devido à disseminação hematogênica do parasito (Figura 1.4) (FUNASA, 2002; Oliveira, 1996).

A forma visceral, também conhecida como calazar, acomete o fígado, o baço, a medula óssea e os gânglios linfáticos, ou seja, onde residem as formas amastigotas. Esta é a forma mais severa da doença, a qual, quando não tratada, apresenta altos índices de mortalidade (Roberts *et al.*, 1995; Zaverucha, 2005). As espécies de *Leishmania* responsáveis pelo calazar, como *L. (L.) donovani* (encontrada principalmente na Índia e África), *L. (L.) infantum* (encontrada na região do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia) e *L. (L.) chagasi* (encontrada na América do Sul) parecem se orientar para as vísceras da cavidade abdominal dos indivíduos humanos, ocasionando alterações marcantes nas funções do baço, fígado e medula óssea (WHO, 1996; Murray *et al.*, 2005). O período de incubação da doença varia entre dois e quatro meses e os sintomas são surtos intermitentes de febre baixa, dor no abdômen, hepato e esplenomegalia, além de alguns sinais clínicos como edema facial, anemia, perda de peso, diarreia e dificuldade respiratória (Handman, 2001; Cunningham, 2002).

Uma grave manifestação da leishmaniose visceral é o aparecimento de reativação da doença em indivíduos anteriormente curados, mas que desenvolveram imunossupressão após contraírem o vírus HIV. Esta manifestação também pode ser especulada para casos nos quais indivíduos são infectados, não demonstram sintomas clínicos evidentes, mas sofrem de doença ativa quando são portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou ainda, quando enfrentam quadros de imunossupressão por qualquer motivo (Alvar *et al.*, 1997; Handman, 2001).



Figura 1.4 – Formas de leishmaniose: a- leishmaniose cutânea; b- leishmaniose mucocutânea; c- leishmaniose difusa e d- leishmaniose visceral ou calazar. Fonte: Leishmania Facts, 2006.

1.6- Transmissão e ciclo evolutivo da *Leishmania*

A transmissão das espécies de *Leishmania* ao hospedeiro ocorre durante a picada de fêmeas do inseto vetor, o flebótomo (Figura 1.5). Este pertence à ordem díptera e também é conhecido vulgarmente, como “mosquito-palha”, “cangalhinha” e “birigui” (UFRGS, 2005). Somente as fêmeas deste inseto necessitam alimentar-se de sangue, para a maturação dos seus ovos, que ocorre sete dias após o repasto. Ao picarem o homem ou animal, produzem escarificações em sua epiderme, rompendo capilares e formando uma espécie de poça de onde obtém o sangue (Pessoa e Barreto, 1948).



Figura 1.5: Inseto vetor, Flebótomo. Fonte: OMS LEISH 96/40

A associação entre a doença e o contato do homem com a floresta tropical foi bem estabelecida antes mesmo de ser conhecido o seu modo de transmissão. A ocorrência de lesões preferencialmente nas partes descobertas do corpo e a acentuada variação sazonal indicavam que a transmissão deveria ser realizada por vetor hematófago (Sabroza, 1981; Lainson e Shaw, 1987).

As espécies de flebotomíneos encontradas em áreas endêmicas do Brasil eram tidas como estritamente silvestres por serem consideradas muito dependentes de fatores ambientais como umidade e temperatura, limitando os seus abrigos naturais as regiões florestais, podendo penetrar em habitações humanas quando estas eram construídas nos limites da floresta (Pessoa e Barreto, 1948). Nos últimos anos, com a urbanização da doença houve uma adaptação do vetor que passou a residir em áreas urbanas e peri-urbanas (Balanco, 2005).

O ciclo evolutivo e a transmissão da *Leishmania* ocorrem em flebotomíneos e hospedeiros vertebrados, que também podem servir de reservatórios do parasito (Cunningham, 2002). O inseto vetor ingere, durante o repasto sanguíneo, formas amastigotas do parasito, contidos em macrófagos e monócitos, no sangue ou na linfa intersticial de vertebrados infectados. As formas

amastigotas são lançadas dentro da probóscide do vetor, diferenciando-se em promastigotas procíclicas flageladas. As formas promastigotas passam por um processo de metaciclo-gênese, onde a divisão dessa forma não infectante adquire virulência, sendo transformada em uma forma indivisível e infectiva chamada metacíclica que ocorre no tubo digestivo (Zaverucha, 2005). As formas promastigotas deslocam-se do epitélio do probócito e migram pela faringe e cavidade bucal, e então durante a próxima alimentação, ao fazer esforço para ingerir sangue, os músculos encarregados pela sucção relaxam e causam a regurgitação do material aspirado, misturado com as promastigotas metacíclicas, e deste modo, infectando o hospedeiro vertebrado (Cimermam, 2002). No hospedeiro vertebrado, os parasitos são fagocitados pelos macrófagos diferenciando-se em amastigota esférica, que se prolifera dentro do fagolisossomo do macrófago (Cunningham, 2002; Rey, 1998). Dentro do fagolisossomo, como é modificado pela presença do parasito, este recebe o nome de vacúolo parasitóforo, as formas promastigotas transformam-se em formas amastigotas e multiplicam-se assexuadamente por divisão binária. A ruptura das células parasitadas resulta na disseminação do parasito na forma amastigota para células do sistema fagocítico mononuclear, que serão fagocitados novamente e eventualmente podem cair na corrente sanguínea ou linfática, atingindo outros órgãos, como o baço, o fígado e a medula óssea, estendendo, assim, sucessivamente a infecção e fechando o ciclo (Figura 1.6) (Zaverucha, 2005; Souza, 2002).

Ao infectar o hospedeiro vertebrado, o parasito se depara com uma série de mecanismos imunológicos que visam conter a infecção. Quando o parasito é depositado pelo flebótomo na pele, ele precisa rapidamente encontrar uma célula hospedeira onde possa se transformar em amastigota e iniciar o seu desenvolvimento intracelular (Zaverucha, 2005). Por não possuir meios ativos de invasão, a infecção da *Leishmania* está confinada a células fagocíticas profissionais, principalmente macrófagos apesar de já terem sido evidenciadas em fibroblastos, células dendríticas e neutrófilos (Rittig e Bogdan, 2000). O papel fundamental dos macrófagos na defesa do hospedeiro é limitar a disseminação e/ou crescimento de microrganismos na fase inicial da infecção e modular a resposta imunológica. A resistência a infecção por *Leishmania* tem sido associada à diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em Th1 (células T citotóxicas CD8⁺ e “Natural Killers”), mas não em Th2 (células B). A resposta do tipo Th1, juntamente com outras células ativadas via moléculas secretadas pelas células Th1 são capazes de eliminar os parasitos e conferir imunidade, enquanto a progressão da doença está associada com uma resposta do tipo Th2 (Roach *et al.*, 1991; Grimaldi Jr. e Tesh, 1993). Enquanto as células T estão associadas à

remissão das lesões por *Leishmania*, as células B têm sido implicadas na susceptibilidade à infecção (Mauel, 1990).

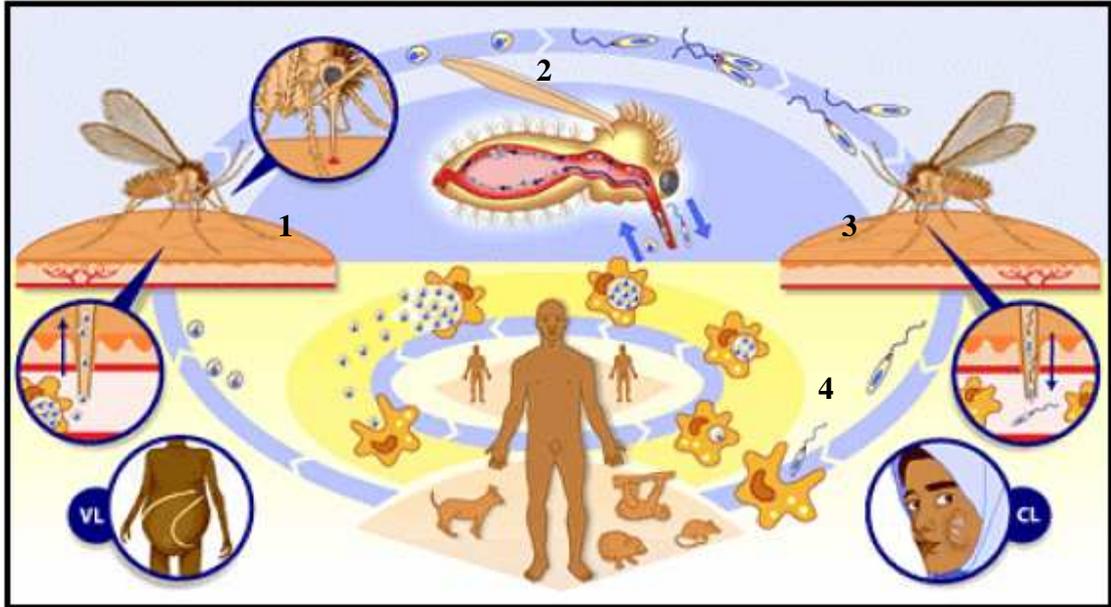


Figura 1.6: Ciclo biológico e modo de transmissão da *Leishmania* spp. Fonte: Leishmania Facts, 2006.

1 - Ao fazer seu repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, o vetor contrai as formas amastigotas do parasito contidas em células do SFM. 2 - As formas amastigotas, no aparelho digestivo do flebótomo, se diferenciam em formas promastigotas, se multiplicam e ficam armazenadas na cavidade bucal do inseto. 3 - Conseqüentemente, em seu próximo repasto sanguíneo, este flebótomo irá transmitir as formas promastigotas para o hospedeiro vertebrado que pode ser o homem ou outros mamíferos como preguiças, gambás, roedores, raposas e até mesmo cães domésticos. Tornando estes hospedeiros fontes de infecção para outros flebótomos, dando continuidade ao ciclo.

1.7- Reservatório

No âmbito ecológico, o homem é um hospedeiro acidental e não parece ter um papel importante na manutenção do parasito na natureza (Gontijo e Carvalho, 2003). O homem é infectado, quando entra nos ecótopos naturais dos reservatórios silvestres. A enfermidade em questão sofreu um processo de endemização em áreas de colonização antiga, como resultado da adaptação do parasito a canídeos, preguiças, gambás, tamanduás, eqüinos e roedores silvestres, que hoje, são considerados importantes reservatórios de *Leishmania* sp. (Cortada, 2004; Lainson e Shaw, 1987). No ambiente doméstico são encontrados vários animais infectados, dependendo da espécie de *Leishmania* em questão, destacando os cães (Cimermam, 2002).

Os cães são reservatórios naturais por serem suficientes para manter o ciclo doméstico de transmissão, sendo considerados os mais importantes reservatórios do parasito no ambiente peridoméstico (Balanco, 2005). O cão apresenta todas as características de um bom reservatório, pois apresenta área de distribuição sobreposta a humana, funciona como fonte de alimentação para o vetor, desenvolve alto parasitismo cutâneo e apresenta alta taxa de infecção (Bisugo, 2007).

Deane e Deane (1954) já salientavam a importância do homem, sintomático ou não, como reservatório da *L. (L.) chagasi*. Apesar da escassez de protozoários na pele, aparentemente normal do indivíduo doente, conseguiu-se infectar 15% dos flebótomos que se alimentaram sobre os pacientes doentes. Posteriormente, concluíram que, pela pouca quantidade de parasitos na pele, o homem não é um bom reservatório e raramente serviria de fonte de infecção para o flebótomo em comparação com a abundância de parasitos encontrados na pele dos cães e raposas.

Os cães infectados podem ou não desenvolver quadro clínico da doença, que apresenta sinais de emagrecimento, eriçamento e queda dos pêlos, febre prolongada, nódulos ou ulcerações (principalmente no focinho e orelhas), diarreia, hemorragias intestinais, paralisia dos membros posteriores, lesões oculares podendo causar cegueira e caquexia (Figura 1.7) (Alvar *et al.*, 1994). Em alguns casos, pode ser fatal. Por isso, vários grupos de pesquisa vêm se esforçando para desenvolver sistemas diagnósticos eficazes para detectar esta doença entre os cães e desta forma, buscar seu controle (Rosati *et al.*, 2003). É importante ressaltar que o fato de alguns cães infectados permanecerem assintomáticos, dificulta o diagnóstico clínico da infecção e conseqüentemente seu controle. A maioria dos cães soropositivos é aparentemente sadia, mas como o parasitismo de vísceras e de pele é intenso, tornam-se bons reservatórios, mesmo em fase precoce da infecção, capacitando-os a infectar o inseto vetor (Ministério da Saúde, 2006). Segundo os trabalhos de Marzzochi *et al.*, 1981, no Brasil, entre os cães inoculados pelos insetos vetores, há uma população de 40% a 60% infectada que permanece assintomática.



Figura 1.7: Cães infectados por *L. chagasi*: a – cão sintomático e b – cão assintomático. Fonte: SUCEN, 2007.

No Brasil, sob o ponto de vista epidemiológico, a LV canina é considerada mais importante que a doença humana, pois a grande quantidade de animais infectados com o parasitismo cutâneo serve como fonte de infecção para o inseto vetor (Neves, 2005). Portanto, o cão vem sendo apontado como potencial hospedeiro doméstico e o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos de leishmaniose (Gomes e Neves, 1998; Monteiro *et al.* 2005).

Visando reduzir as fontes de infecção para o vetor, a eutanásia de cães soropositivos é a principal medida de controle adotada em regiões endêmicas, realizada a partir de inquéritos sorológicos utilizando *Kits* de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) fornecidos pelo Ministério da Saúde (Bisugo, 2007).

Para o diagnóstico da LV canina deve ser considerado a origem epidemiológica do cão e o conjunto de sintomas apresentados. O diagnóstico parasitológico baseado na demonstração do parasito é considerado como “padrão ouro”. A presença de parasitos em esfregaço sanguíneo é rara, porém, como em humanos, o parasita pode ser detectado no baço, fígado, medula óssea e linfonodos, ou ainda na pele do cão, mesmo que aparentemente esteja sadio (Marzochi *et al.*, 1981). O diagnóstico da LV canina também é feito por testes sorológicos que visam a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, assim como no homem. O sangue dos animais é coletado no campo e conduzido a laboratórios que possuam equipamentos para esse fim, onde será processado, podendo demorar alguns dias. Na prática, a ação de saúde pública, que visa identificar e eliminar o cão sorologicamente positivo é realizada de forma pouco eficaz. Assim, a busca do animal sorologicamente positivo torna-se extremamente difícil e, muitas vezes, sua eliminação passa a

ser inócua, pois a retirada deste animal já não se traduz como uma ação eficaz, uma vez que outros animais ao seu redor já se tornaram infectados com potencial de transmissão da doença. Outro fato frequentemente encontrado é que o proprietário do cão infectado, sabendo da possibilidade do animal ser eutanasiado, pode dificultar a eliminação do mesmo (Lira, 2005).

As variações na sensibilidade e especificidade que os testes sorológicos apresentam e a sua demora, demonstra a necessidade de novos trabalhos que visem contribuir para a busca de novos antígenos, de métodos eficientes e de rápido diagnóstico (Neves, 2005).

1.8- Diagnóstico

A suspeita clínica da LV humana não se baseia somente na sintomatologia, uma vez que esta é pouco sugestiva e pode ser confundida com outras patologias tais como malária, esquistossomose hepatoesplênica, tuberculose, doença de Chagas, brucelose, febre tifóide e outras. Já a LT, confunde-se com a hanseníase, dermatites, sífilis cutânea e até câncer de pele, entre outras. Evidências de ordem epidemiológica como, ser procedente de área endêmica, características geográficas da região, tipo de inseto predominante no local, ou existência de cães suspeitos são importantes na caracterização do quadro clínico (Marzochi *et al.*, 1981). Portanto, no diagnóstico sorológico da LV e LT é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças (Soares, 2005; Ministério da saúde, 2005).

Ainda hoje, o “padrão ouro” no diagnóstico da leishmaniose é feito pela identificação do parasito através de métodos diretos (parasitológico), que consistem na visualização da forma amastigota em preparações microscópicas realizadas com fragmentos ou esfregaços de órgãos do SFM identificados pelo corante Giemsa ou pela inoculação do material suspeito em animais suscetíveis, como hamsters ou camundongos (Cunningham, 2002). As formas promastigotas podem ser observadas em culturas de material de punção ou biopsia de órgãos linfóides em meios próprios como Neal, Novy & Nicolle (NNN), Liver Infusion Triptose (LIT), Schneider, entre outros. A especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitos não é homogênea no mesmo tecido. A sensibilidade mais alta (98%) é alcançada quando se utiliza aspirado do baço. As punções esplênicas e de medula óssea são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, não sendo procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em escala preparatória, e muitas vezes são também inadequados para diagnósticos individuais (Soares, 2005; Boarino, *et al.*, 2005). Por esses motivos, os métodos sorológicos são essenciais para diagnóstico da leishmaniose (Boarino,

et al., 2005). Os testes sorológicos mais comumente usados são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imuno-enzimático (ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e o teste da aglutinação direta (DAT), utilizando como antígeno, lisado de *Leishmania* obtida de cultura (Kar, 1995; Cabreira, 1999).

A RIFI vem sendo usada como rotina em inquéritos sorológicos em cães em áreas endêmicas (Marzochi *et al.*, 1981). Estudos experimentais mostram que não existe diferença significativa entre as espécies *L.(L.) chagasi*, *L.(V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* utilizadas como antígeno (Costa *et al.*, 1991). Independente do antígeno empregado a reação fornece, também em cães, (Coutinho *et al.*, 1985; Costa *et al.*, 1991) resultado cruzado com outros tripanosomatídeos, conforme ocorre na espécie humana (Costa *et al.*, 1991; Desjeux, 2004). No entanto, os títulos altos sugerem infecção por *L.(L.) chagasi* (Marzochi *et al.*, 1981).

Desde sua primeira descrição por Engvall *et al.*, 1971, a técnica de ELISA tem contribuído, não só para o diagnóstico sorológico desta enfermidade (Jaffe e Zalis, 1988), como também para outras doenças infecciosas, incluindo a malária (Voller *et al.*, 1974), doença do sono (Voller *et al.*, 1975a), toxoplasmose (Voller *et al.*, 1976b), doença de Chagas (Voller *et al.*, 1975b), amebíases (Bos e Van den Eijk, 1975), doenças bacterianas (Carlsson *et al.*, 1972), virais (Voller *et al.*, 1976a) e micóticas (Hommel *et al.*, 1976). O método de ELISA é tão sensível quanto a RIFI no diagnóstico da leishmaniose, sendo usada em estudos de grande escala, especialmente, na versão simplificada utilizando microplacas de titulação (Hommel *et al.*, 1978).

Na última década, o DAT tem mostrado em vários estudos sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100%. Esta técnica combina altos níveis de validade intrínseca e facilidade de execução, embora apresente problemas na padronização e controle de qualidade do antígeno e não tenha valor no prognóstico da doença. Uma variação do DAT, o FAST (*Fast Agglutination Screening Test*), vem sendo testado para aplicação em episódios epidêmicos e para inquéritos populacionais (Soares, 2005).

A intradermoreação de Montenegro, reação de hipersensibilidade tardia, é bastante empregada no controle da cura (Marzochi *et al.*, 1992). As provas moleculares de detecção e identificação do parasito vêm sendo amplamente empregadas no diagnóstico da doença e estudos taxonômicos (Cupollillo *et al.*, 1994; Degraeve *et al.*, 1994).

A partir do advento da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), a detecção do parasito em tecidos tornou-se sensível e eficaz. Rodgers *et al.* (1990) mostraram que a técnica de PCR é capaz de detectar o kDNA do parasito. Num estudo experimental com 25 cães comprovadamente infectados para *Leishmania*, tanto por cultura como por inoculação em hamster e 35 animais

controles, os autores comprovam 100% de sensibilidade e 100% de especificidade deste teste (Ashford *et al.*, 1995). Outros autores, entretanto, afirmam que, este teste não garante 100% em sensibilidade e especificidade. A maior causa de resultados falsos positivos (devido à alta sensibilidade) é a contaminação com outras amostras, com "amplicons" (produtos amplificados pós PCR), ou ainda o fato de outro tripanosomatídeos possuírem também o kDNA. Já os resultados falsos negativos são decorrentes da possível presença no material em teste, de substâncias que podem inibir, total ou parcialmente, a reação de amplificação pelo DNA polimerase (Barker, 1989; Degraeve *et al.*, 1994).

De uma maneira geral, os antígenos utilizados nos testes diagnósticos são quase sempre derivados de formas promastigotas de cultura, parasitos intactos ou moléculas solúveis. Estes antígenos podem gerar resultados falso positivos, devido reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae, como o *Trypanosoma cruzi* e mesmo com microrganismos filogeneticamente distantes, bem como devido à persistência de anticorpos circulantes após cura clínica. Por outro lado, o resultado falso negativo muitas vezes ocorre em pacientes imunocomprometidos (Desjeux, 2004).

Atualmente, muitos pesquisadores procuram obter um método mais específico de diagnóstico da LV, tanto canina como humana, principalmente, com a utilização de antígenos recombinantes de *Leishmania sp.* As vantagens de seu uso decorrem do fato de que depois destas substâncias, de origem protéica, serem isoladas com significativo grau de homogeneidade, propiciam para o teste de imuno-ensaio uma grande sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, além de minimizar reações cruzadas com certos antígenos presentes em parasitos responsáveis por outras doenças infecciosas, fato este observado, quando do emprego de antígenos tradicionais, ou seja, não recombinantes (Passos *et al.*, 2005).

Dentre as técnicas imunológicas, os ensaios imuno-enzimáticos empregando antígenos quimicamente definidos e específicos do parasito têm sido propostos como uma alternativa aos antígenos naturais. Por exemplo, o antígeno recombinante K39 (rK39) de *L. (L.) chagasi* que é um epítipo imunodominante repetitivo em uma classe de proteínas denominada kinesina que é muito conservado entre as espécies de leishmanias viscerotrópicas, tem se mostrado sensível e específico para o diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos e cães, através da técnica do ELISA ou de testes imunocromatográficos (tiras de teste rápido) em campo (Badaró *et al.*, 1996; Rosati *et al.*, 2003). Outros antígenos recombinantes de *L. (L.) chagasi* bem definidos como o K9 e o K26 estão sendo avaliados quanto as suas capacidades de conduzirem epítipos imunodominantes e serem utilizados como marcadores em diagnósticos imunológicos (Bhatia *et*

al., 1999). Uma proteína também recentemente estudada, a proteína de choque térmico, HSP70, mostrou grande utilidade em técnicas sorológicas como o ELISA (Perez-Alvarez *et al.*, 2001; Zurita *et al.*, 2003). O método IT-Leish, da empresa DiaMed (Índia) é um teste imunocromatográfico (teste rápido), o qual foi desenvolvido para diagnosticar a leishmaniose visceral, utilizando o rK39 (Ritmeijer *et al.*, 2006). Há outro teste da mesma natureza, chamado de *Kalazar Detect* produzido pela empresa InBios International (EUA). Ambos mostraram ser bastante específicos e já são comercializados. Eles detectam a presença de anticorpos que reconhecem o antígeno rK39, específico para a LV humana (Carvalho *et al.*, 2003; Sundar *et al.*, 2006). Esta última empresa ainda comercializa o teste *Kalazar Detect Animal Rapid Test*, que consiste no mesmo teste, porém para diagnóstico canino.

Embora existam métodos de diagnóstico e tratamento específicos, grande parte da população não tem acesso a estes procedimentos, dificultando o diagnóstico precoce com a evolução da doença e, conseqüentemente, elevando os índices de mortalidade. Nos países endêmicos, a LV continua negligenciada pelo setor privado de saúde e tem cabido ao setor público investir, apesar dos recursos escassos e infra-estrutura inadequada, no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas e métodos de diagnósticos mais eficientes (Soares, 2005).

1.9- Busca de novos antígenos

A partir da década de 70, do século passado, novas tecnologias foram desenvolvidas permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado de clonagem gênica, que faz parte da tecnologia do DNA recombinante. Esta última tem uma grande aplicação e pode ser usada para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação da seqüência de um gene e, conseqüentemente, da proteína que ele codifica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis tais como a insulina humana, hormônio de crescimento, antígenos e enzimas industriais em grandes quantidades. Sua aplicação comercial ou biotecnológica parece ter um potencial inesgotável (Campos, 2007; Nascimento *et al.*, 2007).

A partir de abordagens moleculares como o rastreamento de bibliotecas de expressão de genes de *Leishmania* com soros de animais e de humanos infectados, diferentes moléculas antigênicas foram identificadas com uso potencial no desenvolvimento de vacinas e diagnóstico das leishmanioses (Alberts *et al.*, 2006). Algumas dessas moléculas descritas em trabalhos são antígenos protéicos, lipídicos e/ou glicídicos como, por exemplo, a GP63 (Afrin *et al.*, 2002); a

LACK (kinase C Ativada de *Leishmania*) (Soussi *et al.*, 2000), o LPG (Chakrabarty, 1996), a D13 ou p80 (Ahmed *et al.*, 2003; White Jr., 1988), a K9 e a K26 (Bathia *et al.*, 1999), a proteína de leishmania homóloga a proteína ribossomal eucariótica, LeiF (Price, 2001) e a proteína A2 específica de amastigota (Martins *et al.*, 2006), entre outras. Cada uma dessas moléculas antigênicas apresenta características particulares que as tornam capazes de estimular a resposta imune do hospedeiro (Campos, 2007). A proteína GP63 é uma metaloprotease conservada nas espécies de *Leishmania* e constitui o mais abundante antígeno de membrana destes parasitas. Pesquisas demonstraram que a GP63 induz significativa proteção em animais experimentais (Afrin *et al.*, 2002). A proteína LACK foi identificada por estimular a ação protetora das células Th1 (Soussi *et al.*, 2000). Estudos acerca de um antígeno com 80 kDa de *L. (L.) donovani*, chamado de D-13, evidenciaram ser esta uma proteína altamente imunogênica, além de útil na profilaxia e no diagnóstico da leishmaniose visceral (White Jr., 1988). O LPG, um glicolípido, é considerado a maior molécula de superfície desses parasitas e também possui potencial para indução da resposta imune (Afrin *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2003). Outras proteínas também têm sido reconhecidas por soros de cães e humanos como as proteínas ribossomais, as histonas e as kinesinas (Rosati *et al.*, 2003; Scalone *et al.*, 2002).

Na área de reativos para diagnóstico do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) vem-se trabalhando com afinco para gerar em curto prazo, novos produtos para imunodiagnósticos, atividade extremamente relevante, principalmente, por se enquadrar na política do Ministério da Saúde, na área de controle e diagnóstico de doenças infecto-contagiosas, melhorando desta forma, as ações do Sistema Único de Saúde dedicados a população. Dentre os *kits* de diagnóstico produzidos por Bio-Manguinhos relacionados à leishmaniose, cita-se: RIFI para leishmaniose humana e o ELISA para a leishmaniose humana e canina (Bio-Manguinhos, 2007). É importante ressaltar que, até o presente momento, os produtos afins gerados e fornecidos aos centros de referência de saúde, disponibilizam antígenos naturais, isto é, extrato bruto proveniente do parasito, cujos problemas já foram descritos anteriormente.

Em virtude do exposto no último parágrafo, plasmídeos bacterianos contendo os genes responsáveis pela síntese de proteínas recombinantes de *Leishmania (L.) chagasi*, foram cedidos pelo Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM – FIOCRUZ), situado em Salvador-BA, para o desenvolvimento de estudos quanto a sua imunogenicidade no diagnóstico de leishmaniose visceral. Este conjunto de clones recombinantes foi selecionado a partir da confecção de duas bibliotecas de cDNA e uma genômica de *Leishmania chagasi*, obtida pelo Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira. As proteínas recombinantes

de *L. (L.) chagasi* foram selecionadas a partir de antígenos da biblioteca de cDNA, os quais foram testados através de uma mistura de soros de quatro cães infectados naturalmente com LV. A identificação e caracterização dos insertos foi realizada utilizando-se as seqüências obtidas no sequenciamento preliminar em buscas no programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) contra seqüências protéicas de tripanosomatídeos disponíveis nas páginas do banco de dados do GenBank no NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). O potencial das proteínas para a utilização em imunodiagnóstico foi evidenciado em experimentos preliminares no CPqGM/BA e estão em processo de patente, juntamente com suas seqüências genômica e peptídica. As construções foram seqüenciadas pelo Centro de pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/PE), estando presente na seqüência de *Leishmania chagasi*. Os plasmídeos recebidos, contendo os insertos e utilizados na engenharia genética foram pRSETB (Invitrogen) e o pBK-CMV (Stratagene), os quais possuem gene de resistência para antibióticos (Figura 1.8).

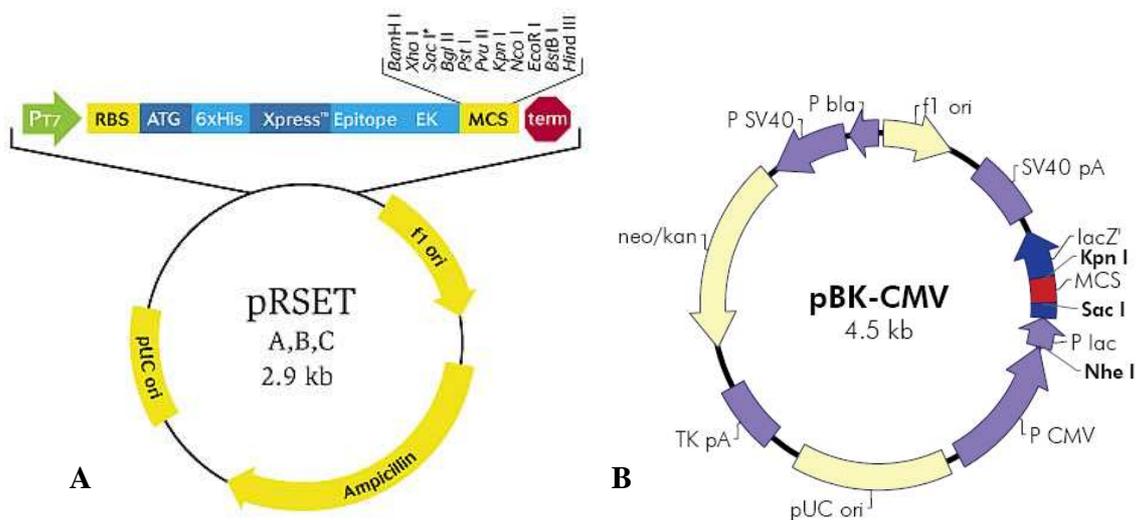


Figura 1.8: Esquema dos plasmídeos.

A: Plasmídeo pRSETB. Fonte: Invitrogen, 2007. B: Plasmídeo pBK-CMV. Fonte: stratagene, 2009.

As referidas proteínas foram classificadas como Lc9 e Lc13. Estes recombinantes representam fragmentos da proteína kinesina e da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) de *L.(L.) chagasi*, respectivamente.

A proteína recombinante Lc9 teve sua seqüência genômica inserida no plasmídeo pRSETB, o qual possui o gene que codifica uma cauda de seis histidinas fusionada na sua extremidade amino-terminal, com objetivo de facilitar sua purificação. A Lc9 possui massa molecular estimada de 44 kDa e tem homologia com uma proteína de citoesqueleto do parasito, a

kinesina. A proteína kinesina está localizada no cinetoplasto de *Leishmania*, assim como a proteína rK39 que apresenta seqüência idêntica em sete espécies de *Leishmania* e já é usada em vários testes de diagnóstico para leishmaniose, onde a reatividade com outros tripanossomatídeos mostrou-se negativa (Badaró *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2001). As kinesinas representam um importante fator de virulência do parasito (Rodriguez, 2003). A superfamília das kinesinas é composta por proteínas motoras do citoesqueleto e as mesmas têm papel importante em uma variedade de processos celulares fundamentais, incluindo a divisão celular, transporte vesicular, sinal de transdução e dinâmica de microtúbulos (Burns *et al.*, 1993; Goldstein e Philp, 1999).

A outra proteína recombinante, a Lc13 tem homologia com a proteína HSP70 com massa molecular estimada de 88 kDa. O termo HSP compreende diferentes famílias de proteínas classificadas de acordo com o seu peso molecular. A família das HSP70 compreende proteínas abundantes, extremamente conservadas ao longo da evolução e de maior atividade imunogênica, podendo ser encontrada em várias organelas, inclusive na mitocôndria (Buchner, 1996; Kiang e Tsokos, 1998). As HSP70s de diversos organismos patógenos possuem função “chaperone”, ou seja, atuam no dobramento, transporte e secreção de proteínas recém sintetizadas, bem como na montagem e dissociação de complexos multiprotéicos (Kiang e Tsokos, 1998). Estas funções são necessárias durante a adaptação aos diferentes ambientes e temperaturas, onde sua expressão é estimulada, como também durante as mudanças bioquímicas e morfológicas sofridas pelo parasito no momento da transição das formas promastigotas metacíclicas no inseto vetor para a forma amastigota no hospedeiro vertebrado, permitindo a sua sobrevivência (Hartl, 2002; Miller, 2000; Karlin e Brocchieri, 1998). Vários autores que estudaram as HSP70s de *Leishmania spp.* descreveram seu alto poder de estimulação da resposta imune, já que podem sinalizar ao sistema imune a infecção. Provavelmente, pela sua quantidade abundante, tornando-se antígenos proeminentes que fazem parte dos fatores de virulência do parasita e sendo identificadas como imunogênicas por produzirem resposta humoral e celular específica contra *Leishmania spp.* (Costa *et al.*, 1999; Kiang e Tsokos, 1998). Diversas pesquisas destacaram a importância das HSP70s como potentes antígenos indutores da produção de anticorpos específicos para o diagnóstico em pacientes infectados (Blackwell, 1992; Costa *et al.*, 1999).

1.10- Relevância do Estudo

As leishmanioses apresentam-se, atualmente, como o segundo grupo mais comum de doenças causadas por protozoários depois da malária, e estão entre as mais importantes doenças infecciosas tropicais combatidas pela Organização Mundial de Saúde. Nos inquéritos de diagnóstico da doença, o ELISA, tem sido amplamente utilizado. Em testes sorológicos baseados no protozoário inteiro ou em extrato do parasito os resultados falsos positivos ocorrem com alguma frequência. Alguns autores admitem que os testes afins apresentam boa sensibilidade, entretanto com baixa especificidade (Kar, 1995 e Cabrera, 1999). Isto é devido à significativa incidência de reações cruzadas com outros antígenos protéicos de outras espécies de tripanosomatídeos que compartilham alguma similaridade estrutural. A fim de minimizar esta ocorrência é importante diminuir a complexidade protéica das preparações em uso nos propalados testes. Para tanto, em face da notória dificuldade de se obter preparações de antígenos com baixo teor celular (não recombinantes), com significativa homogeneidade, a partir de extratos ou preparações brutas, contendo um exagerado número de proteínas, criou-se à estratégia de purificação com a introdução da recombinação genética. No caso, a referida estratégia foi montada em cima de algumas proteínas recombinantes previamente selecionadas, alvo em potencial, para os aludidos testes. Os testes sorológicos, atualmente disponíveis e baseados no uso de apenas um antígeno recombinante, podem apresentar especificidade variável, uma vez que nem todos os indivíduos infectados por *Leishmania* produzem anticorpos contra um mesmo determinado antígeno do parasito (Brandonisio *et al.*, 2002; Sundar *et al.*, 2006). Dessa forma, é importante a ampliação do painel de antígenos recombinantes, por meio de seleção e produção, para o desenvolvimento de testes sorodiagnósticos mais sensíveis e específicos.

Desta forma, o desenvolvimento técnico-científico gerado por este trabalho enseja emprestar uma maior qualidade ao ensaio de imunodiagnóstico da leishmaniose canina, contribuindo assim, no controle da doença também em humanos.

2 – OBJETIVOS

2.1- Objetivos Gerais:

O objetivo deste trabalho foi expressar, isolar, purificar, caracterizar físico-química e imunologicamente os antígenos recombinantes, Lc9 e Lc13, de *Leishmania chagasi*. Como também padronizar um ensaio imunoenzimático (ELISA), visando a proposição de um imunodiagnóstico para a leishmaniose visceral canina.

2.2- Objetivos Específicos:

Analisar a expressão gênica;

Produzir proteínas recombinantes;

Isolar e purificar as proteínas recombinantes;

Caracterizar físico-química e imunologicamente os antígenos recombinantes;

Analisar a homogeneidade das preparações purificadas dos antígenos trabalhados;

Analisar a imunogenicidade destes antígenos;

Contribuir para melhoramento de um teste sorológico por ELISA da leishmaniose canina a partir dos antígenos, Lc9 e Lc13, encontrados no parasito e clonados na bactéria *E.coli*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) e no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da FIOCRUZ.

3.1- Obtenção dos plasmídeos

Os plasmídeos (pRSETB - Invitrogen e pBK-CMV - Stratagene) contendo os genes responsáveis pela síntese das proteínas recombinantes de *Leishmania (L.) chagasi*, foram cedidos pelo Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM – FIOCRUZ), situado em Salvador-BA.

3.2- Extração e purificação do DNA plasmidial

Os plasmídeos recebidos foram inseridos em bactéria *Escherichia coli*, cepa Top 10 (Invitrogen) por eletroporação (200 Ω , 25 μ F e 2,5kV). As bactérias transformadas foram inoculadas em meio de cultura Luria - Bertani (LB) (10 g/L bacto-triptona, 5 g/L extrato de levedura e 5 g/L NaCl) e cultivadas a 37°C durante 18 horas, sob agitação de 200 rpm. Após o crescimento, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos. As bactérias isoladas foram lisadas para extração e purificação do DNA plasmidial de acordo com Sambrook e Russel (2001). As extrações plasmidiais (mini-preparações) foram realizadas segundo o protocolo do *kit* Qiaprep da empresa Qiagen e tiveram como objetivo amplificar a quantidade de plasmídeos recebidos.

3.3- Eletroforese em gel de agarose

Após a extração, o DNA plasmidial foi analisado por eletroforese em gel de agarose (Sigma Chemical Co.) a 0,8%. As bandas eletroforéticas relativas ao DNA foram visualizadas com uma solução corante de brometo de etídio (Sigma Chemical Co.) na concentração de 1 μ g/mL (Sambrook e Russel, 2001). Utilizou-se como padrão de peso molecular fragmentos de DNA de fagos λ digerido por *Hind*III (Invitrogen) e enzimas de restrição (*Bam*HI, *Kpn*I e *Xho*I

/Invitrogen) para linearizar o plasmídeo. As bandas eletroforéticas foram observadas em transluminador de luz UV (300 nm) e fotografadas.

3.4- Transformação bacteriana e expressão das proteínas recombinantes

3.4.1- Bactéria hospedeira

Os plasmídeos, com os genes que codificam as proteínas recombinantes de *Leishmania (L.) chagasi* foram inseridos na bactéria receptora, a *Escherichia coli*, cepa *BL21 DE3/pLysS* (Invitrogen) que possui resistência ao antibiótico cloranfenicol. Os plasmídeos conferem resistência ao antibiótico ampicilina.

3.4.2- Preparo de células competentes

As bactérias *Escherichia coli* linhagem *BL21 DE3/pLysS*, não transformadas, foram cultivadas em meio LB líquido a 37°C, com agitação de 200 rpm durante 18 horas. Após este pré-inóculo, a cultura foi diluída em meio LB na proporção de 1:100 v/v até atingir a absorvância de 0,6 a 600 nm. A suspensão foi centrifugada a 5.000 x g, por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento (pellet) foi ressuspense em solução tampão Tris HCl 10 mM pH 8,0 contendo CaCl₂ 50 mM e colocado no gelo por 15 minutos. A suspensão foi centrifugada a 5.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspense na mesma solução tampão logo acima mencionada e adicionado glicerol a 15%. As bactérias foram separadas em alíquotas e armazenadas em nitrogênio líquido (Chung *et al.*, 1989).

3.4.3- Transformação bacteriana e preparo de estoques

O plasmídeo contendo uma seqüência de cDNA responsável pela proteína a ser expressa, foi introduzido nas bactérias competentes, crescidas conforme o item 3.4.2, através do método de choque térmico (Qiagen, 2003), para a posterior expressão de proteínas. As bactérias transformadas foram cultivadas em uma incubadora com agitação orbital a 37°C por 18 horas em condições estéreis. Em seguida, as bactérias foram semeadas em meio LB semi-sólido, com adição dos antibióticos cloranfenicol e ampicilina. Como controle, foram preparadas placas com bactérias competentes não transformadas (Sambrook e Russel, 2001). Após a transformação, foi

feito um pré inoculo, em meio LB líquido com antibióticos (ampicilina 50µg/mL e cloranfenicol 35µg/mL), utilizando uma colônia da bactéria disposta na placa. Posteriormente, foram retiradas alíquotas da cultura adicionando o glicerol (15% v/v) e armazenadas em nitrogênio líquido para compor um banco de células transformadas.

3.4.4- Expressão de proteínas

A expressão das proteínas foi realizada baseando-se no protocolo desenvolvido pelo CPqGM/BA FIOCRUZ. O crescimento das culturas de *E. coli* contendo o inserto codificante da proteína recombinante de *Leishmania chagasi* (Lc9 ou Lc13) foi realizado através da utilização de pré-inóculos cultivados durante 16-18h, a 37°C, sob agitação de 200 rpm e na presença de ampicilina (50µg/mL) e cloranfenicol (35µg/mL). Estes pré-inóculos foram colocados em frascos com meio de cultura LB (3L) na proporção de 1:100 v/v com os antibióticos anteriormente citados e submetidos às condições de cultivo pré-estabelecidas, até que suas absorvâncias a 600nm alcançassem valores compreendidos entre 0,4 e 0,6 conforme leitura em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU 530). A indução ocorreu pela adição de um análogo da lactose, IPTG (Isopropiltio-β-D-galactosídeo) em concentração de 1 mM de acordo com protocolo operacional previamente padronizado (GE Healthcare, 2000). O cultivo, para a expressão, foi mantido por 4h a 37°C. Após este período, alíquotas foram retiradas para a análise de desempenho da indução por eletroforese desnaturante descontínua em gel de poliacrilamida a 12 % (Laemmli, 1970; Schägger & von Jagow, 1987).

3.5- Purificação dos antígenos recombinantes

3.5.1- Purificação da proteína Lc9

- Lise bacteriana para obtenção da Lc9

Cada cultura foi centrifugada a 6.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em solução tampão fosfato de sódio 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 150 mM, inibidor de protease PMSF (Fluoreto de fenil metil sulfonil) 1mM e lisozima 5 mM, seguindo a relação de 1g de massa celular úmida/10 mL de solução tampão. O rompimento celular foi realizado em sonicador Branson Sonifier 450, usando três pulsos de ultra-som de trinta segundos,

com um intervalo de dois minutos entre eles em banho de gelo. O material rompido foi centrifugado (6.000 x g, por 20 minutos, à 4° C) para separação do sedimento. O sobrenadante foi armazenado em *freezer* a - 20° C para posterior purificação.

- Purificação por cromatografia de afinidade

Os extratos brutos contendo a proteína recombinante Lc9, foram fracionados por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) com a resina Ni-NTA *Superflow* agarose (Qiagen), em coluna PD10. Utilizou-se uma solução tampão fosfato de sódio 20 mM contendo NaCl 150 mM, pH 8,0 para equilibrar a coluna e uma solução tampão eluente de igual composição com acréscimo de imidazol 500 mM (Merck) para deslocamento das frações ligadas à coluna (Qiagen, 2003). À medida que ocorria a eluição da coluna, frações equivalentes a 1mL, foram coletadas para análise eletroforética e determinação das absorvâncias a 280 nm, que neste último caso, serviram para a constituição do perfil cromatográfico.

- Purificação por cromatografia de exclusão e peneiração molecular (gel filtração)

As frações cromatográficas, isoladas pela cromatografia de afinidade e contendo a proteína recombinante, foram submetidas à dessalinização usando-se uma solução tampão Tris HCl 10mM pH 8,0 seguida da cromatografia em coluna Sephadex G-25 (0,8/7,5 cm). A cromatografia de exclusão e peneiração molecular preparativa, em uma coluna de Superdex 200 HR 30/10, foi efetuada em uma estação de trabalho da Pharmacia Biotech (HPLC/FPLC). A eluição da amostra contendo a proteína recombinante foi feita com uma solução tampão Tris-HCl 50mM contendo NaCl 150mM, pH 8,0. Nesta mesma coluna foi feita a estimativa de peso molecular da proteína na forma nativa a partir do emprego de um conjunto de padrões protéicos de peso molecular conhecido (GE Healthcare). A detecção das frações protéicas foi feita pelas leituras das absorvâncias a 220 nm e 280 nm dos efluentes da coluna de filtração molecular (GE Healthcare, 1993).

3.5.2- Purificação da proteína Lc13

- Lise bacteriana para obtenção da Lc13

Cada cultura do microorganismo foi centrifugada a 6.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sedimento bacteriano foi ressuspensão em solução tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,0 e adicionado o inibidor de protease PMSF a 1mM e a lisozima a 5 mM (1g de massa celular úmida/10mL de solução tampão). O rompimento celular foi realizado em um sonicador Branson Sonifier 450, usando três pulsos de ultra-som, durante trinta segundos, com um intervalo de dois minutos entre eles e em banho de gelo. O material rompido foi centrifugado a 6000 x g por 20 minutos a 4°C para a separação do sedimento. O sobrenadante foi guardado e o sedimento foi ressuspensão em solução tampão Tris HCl 50 mM contendo uréia 8 M, pH 8,0, conforme protocolo usado para a obtenção de proteínas a partir de corpos de inclusão celular (GE Healthcare, 2000). Posteriormente, estas amostras foram analisadas por SDS-PAGE e depois armazenadas em *freezer* a - 20°C.

- Purificação por cromatografia de troca iônica

A amostra obtida após lise bacteriana foi submetida à cromatografia de troca iônica em uma coluna poros HQ (0,25/10 cm) (GE Healthcare) de 100 mL, a qual foi equilibrada com Tris-HCl 50mM com uréia 4M. A proteína de interesse foi deslocada por meio de gradiente salino, utilizando a solução tampão Tris-HCl 50mM, NaCl 1M, uréia 4 M, pH 8.0 (GE Healthcare, 2002; Silva Jr., 2004 e Deutscher, 1990). A detecção das frações protéicas foi feita pelas leituras das absorvâncias a 220 nm e 280 nm (GE Healthcare, 1993). Esta etapa cromatográfica foi efetuada em uma estação de trabalho da Pharmacia Biotech (HPLC/FPLC).

3.6- Diálise das amostras

As frações cromatográficas isoladas, contendo a proteína recombinante, foram submetidas à diálise em membrana *Spectra/Por* com *cut-off* de 12-14000. A solução tampão utilizada foi Tris HCl 10mM pH 8,0, a qual foi trocada 3 vezes, a cada 3 horas, sob 4°C.

3.7- Concentração das amostras

As frações cromatográficas contendo a proteína Lc9 ou Lc13, foram concentradas por liofilização (liofilizador Labconco, modelo *Lyph lock* 1L).

3.8- Quantificação de proteína

A estimativa da concentração de proteína foi feita de acordo com o método de Folin-Lowry modificado, proposto por Peterson *et al.*, 1983, usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.9- Análise da homogeneidade protéica

A homogeneidade das proteínas recombinantes submetidas às etapas de purificação foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), em cuba vertical Mini Protean II (Bio-Rad), segundo Laemmli (1970). Foram usados géis de poliacrilamida e/ou soluções tampões contendo ora simplesmente glicina 12% ora tricina 10% (solução catódica). Para a determinação do peso molecular (PM) dos polipeptídeos por SDS-PAGE, foram utilizados padrões de proteínas de pesos moleculares conhecidos (*Broad range*, Bio Rad). As bandas eletroforéticas foram reveladas com a solução contendo água: metanol:ácido acético (30:8:62, v/v/v) e o corante *Coomassie brilliant blue* R 250 (0.2 g%) e descorado com a solução de metanol: ácido acético: água (30:8:62, v/v/v) (Schägger and von Jagow, 1987; Silva Jr., 2001).

3.10- Caracterização dos antígenos recombinantes

3.10.1- Determinação do ponto isoeletrico

As amostras protéicas foram submetidas à focalização isoeletrica, utilizando-se *pre-cast* (pré-moldados) géis de poliacrilamida apresentando gradiente de pH entre 3-9 (Phastsystem, GE Healthcare). As amostras contendo as proteínas recombinantes alvo foram reveladas com a mesma solução do corante *Coomassie Brilliant Blue* R-250 supracitado. O ponto isoeletrico (pI)

foi estimado utilizando uma curva de padrões *broad* (de amplo espectro) de pI e analisados pelo programa computacional Image master.

3.10.2- Determinação de peso molecular

O peso molecular das preparações contendo as proteínas recombinantes, Lc9 e Lc13, foi determinado por cromatografia de exclusão e peneiração molecular em uma coluna Superdex 200 HR 10/30 usando-se como eluente a mesma solução tampão (Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 8.0) empregada no isolamento da fração recombinante Lc9. As frações protéicas, assim como as proteínas padrões de pesos moleculares conhecidos (variação de PM 29.000 – 669.000, GE Healthcare) foram detectadas pelas leituras da absorvâncias a 220 nm e 280 nm. Uma solução do corante Blue Dextran (PM 2.000.000) foi também submetida à cromatografia em condição igual às usadas para os antígenos alvo e as proteínas padrões. No caso, além da determinação de V_e/V_o (volume de eluição/volume de exclusão), efetuou-se o cálculo de K_{av} (coeficiente médio de distribuição) cujo valor é expresso pela relação abaixo:

$(V_e - V_o) / (V_t - V_o)$, onde V_t é o volume total da coluna (*bed*).

3.10.3- Caracterização imuno-química por *Western Blot*

As preparações purificadas dos antígenos recombinantes Lc9 e Lc13, foram submetidas à eletroforese desnaturante na presença de tricina 10% (tricina SDS-PAGE) e posterior transferência para membranas de nitrocelulose (BioRad), por meio de um eletrotransferidor (BioRad), segundo Towbin *et al.* (1979). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução PBS (solução salina tamponada com fosfato pH 7,0) contendo leite desnatado em pó a 5 % (Molico - Nestlé) por duas horas 37°C. As membranas então foram incubadas por uma hora a 37°C com soro de cão positivo e negativo para leishmaniose, na diluição de 1:100 (v/v) com a mesma solução tampão de bloqueio. As lavagens foram feitas com solução de Tween 20 (0,05%) em PBS após cada etapa de incubação. Em seguida, as membranas foram tratadas com um conjugado anti-IgG de cão, marcado com peroxidase, por uma hora. Finalmente, as bandas foram reveladas por reação com diaminobenzidina (Sigma Chemical Co.) 0,01% em PBS e 0,003% de água oxigenada. Após, cerca de cinco minutos, a reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.11- Ensaio imunológico

3.11.1- Obtenção do anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase

O conjugado anti-IgG de cão marcado com peroxidase (Ig G-peroxidase) foi preparado segundo a técnica proposta por Nakane e Kawaoi (1974), utilizando anticorpo contra soro de cão, produzido em cabra, lote 0135N07, cedido pelo setor de insumos e conjugados (SEICA) do Departamento de Reativos e Diagnósticos (DERED) do Instituto de Imunobiológicos/Bio-Manguinhos da FIOCRUZ.

Em uma etapa prévia a reação de conjugação, procedeu-se a reação de oxidação da enzima peroxidase pelo meta-periodato de sódio (NaIO_4), em meio aquoso. Nesta etapa, três alíquotas, de 5 mg cada, da enzima peroxidase (Sigma Chemical Co.), foram pesadas e transferidas para três diferentes frascos, aos quais adicionou-se 1 mL de água destilada e a massa correspondente de NaIO_4 , de modo a obter as concentrações finais de 0,05 M, 0,1 M e 0,2 M deste sal, a fim de otimizar o conjugado a ser utilizado neste ensaio imunológico. As misturas foram mantidas sob agitação, à temperatura ambiente, por 20 minutos. Após este tempo, as amostras foram equilibradas, por diálise, contra uma solução tampão acetato de sódio 1 mM, pH 4,4 e submetidas a cromatografia em SephadexTM G-25 (Colunas PD-10, GE Healthcare).

Para a reação de conjugação, cada uma das soluções contendo a enzima peroxidase oxidada foi misturada a 1 mL de suspensão protéica, contendo 10 mg da imunoglobulina (IgG) anti-cão. As misturas foram deixadas sob agitação, por duas horas, à temperatura ambiente. Após o tempo reacional, adicionou-se uma quantidade de boridreto de sódio (NaBH_3) (Sigma Chemical Co.), de modo que a concentração final deste sal, em cada uma das amostras, fosse de 0,1M. Após homogeneização, as misturas foram mantidas por mais duas horas, a 4°C. Ao término da reação, as amostras foram eluídas com solução tampão fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,4, em colunas PD-10 (GE Healthcare), para a troca do tampão e remoção de compostos de baixo peso molecular.

A concentração de peroxidase (HRP) e de IgG, assim como da IgG conjugada, nas amostras obtidas foi calculada a partir da determinação das absorvâncias a 403 nm e 280 nm, respectivamente, em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU 530). O cálculo utilizado para a determinação da concentração das referidas proteínas foi realizado conforme descrito por Presentini e Terrana (1995), utilizando os valores de coeficiente de extinção molar de 2,5 para a

enzima peroxidase e 1,4 para a IgG, nos respectivos comprimentos de onda, e considerando o peso molecular (PM) da IgG igual a 150.000 e o PM da HRP igual a 44.000.

As amostras de anticorpos conjugados foram também analisadas quanto a atividade enzimática, seguindo os parâmetros estabelecidos no procedimento descrito pelo fabricante (Sigma), para o controle de qualidade da enzima, utilizando o composto tetrametilbenzidina (TMB), como substrato na reação (Josephy *et al.*, 1982). Para a avaliação da atividade enzimática, cada uma das amostras de conjugado foi diluída 1000 vezes com PBS 0,01 M, pH 7,4. Desta diluição foram adicionados 100µL ao meio reacional contendo, um volume final de 3 mL, preenchido com solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,0, água oxigenada e solução de TMB, nas concentrações finais de 10 mM, 60 µM e 740 µM, respectivamente. A variação da absorvância a 652 nm (ΔA_{652nm}) foi monitorada em um espectrofotômetro (Beckman, modelo DU 530), por dois minutos, a 20°C, para a determinação da cinética de reação. O branco reacional foi elaborado a partir da adição de 100 µL de solução tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, em detrimento da amostra.

No caso, por convenção, a atividade enzimática é a quantidade de enzima necessária para formar 1 mol do produto de oxidação do TMB por mililitro em 1 minuto. Desta forma, para o cálculo da atividade enzimática foram utilizados os valores numéricos de ΔA_{652nm} , determinados pela diferença algébrica entre o último e o primeiro valor de absorvância obtidos no primeiro minuto de reação, descontando-se a variação observada para o branco reacional, o fator de diluição da amostra e considerando o coeficiente de extinção molar do complexo formado a partir da oxidação do TMB que neste comprimento de onda é igual a $3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Josephy *et al.*, 1982).

Assim, para o cálculo da mencionada atividade enzimática (A_e), utilizou-se a fórmula:

$$(A_e) = \frac{[(\Delta A_{652 \text{ nm}} \text{ da amostra}) - (\Delta A_{652 \text{ nm}} \text{ do branco})] \times (3) \times (\text{fd})}{(3,9 \times 10^4) \times (0,1)}$$

Onde:

3 = volume reacional, em mL;

fd = fator de diluição da amostra;

$3,9 \times 10^4$ = coeficiente de extinção molar do complexo formado a partir da oxidação do TMB e

0,1 = volume da solução contendo a amostra, em mL.

3.11.2- Padronização do ensaio imuno-enzimático (ELISA)

O desenvolvimento do ensaio de ELISA indireto foi iniciado pela seleção das concentrações do antígeno (Lc9, Lc13) e do conjugado. De uma forma geral, 100 uL de uma solução do tampão carbonato e bicarbonato de sódio 0,016 M e 0,034 M, respectivamente, pH 9,6 contendo diferentes concentrações do antígeno (100, 200, 300, 400 e 500 ng por poço) foram adicionados aos poços da microplaca de poliestireno (Microlon 600 fundo U Greiner) para adsorção dos antígenos alvo. Após o período de 16 a 18 horas de incubação a 4°C, foram efetuadas 3 lavagens com PBS-T (solução tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,2) para a retirada do material não adsorvido. Foram então aplicados na microplaca 100 uL dos soros controles (soro canino positivo e negativo para leishmaniose) e soros testes diluídos na solução tampão de diluição do soro/conjugado, a qual serve para bloqueio (1g albumina bovina, 100 mL soro bovino adulto, 50 mL PBS-T e 200 uL Katon CG biocida completado para 1L com água destilada e acrescido de leite mólico Nestlé a 2%).

As amostras (soros caninos) foram dispostas nas microplacas, em triplicata, de forma que a concentração do antígeno, a diluição do conjugado e a solução tampão sem soro (SS) fossem todos avaliados visando a padronização do ensaio, como exemplificado na figura 3.1.

	Ag: Lc9 ng						Ag: Lc13 ng					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
B	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
C	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP
D	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
E	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
F	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
G	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
H	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
	5.000	10.000	15.000	20.000	30.000	40.000	5.000	10.000	15.000	20.000	30.000	40.000
	Diluição Conjugado						Diluição Conjugado					

Figura 3.1: Representação esquemática de um teste de ELISA para a seleção do título do antígeno e do conjugado, com as amostras controles. Onde: Ag: refere-se à variação da concentração do antígeno (100 a 500ng), CP – controle positivo, CN – controle negativo e SS – reação sem soro.

Após um período de incubação de 30 min a 37°C, procedeu-se a uma nova lavagem com PBS-T para a retirada do material não adsorvido nesta etapa da reação. Em seguida, adicionou-se

nos poços da microplaca 100 uL das diluições dos conjugados anti-cão marcados com HRP (5, 10, 15, 20, 30, 40 mil vezes) e procedeu-se a incubação por 30 min a 37° C. Uma nova lavagem, com PBS-T, foi feita para a retirada do conjugado não ligado. Continuando, foi adicionado, a cada poço da microplaca, 100 uL da solução contendo o substrato (H₂O₂ a 10%) e o cromógeno TMB (Tetrametilbenzidina 1%, Sigma Chemical Co.), para revelação do ensaio por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, a reação foi interrompida com a adição de 50 uL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2M. As densidades óticas foram determinadas a 450 nm em um leitor de microplacas (Tecan/Magelan).

3.11.3- Caracterização de painel

Para a estimativa dos níveis de sensibilidade, especificidade e valores preditivos a partir dos ensaios de ELISA, foram utilizados painéis de soros caninos (138 soros positivos e 119 negativos) disponíveis no laboratório, os quais foram caracterizados pelos critérios parasitológico, clínico, epidemiológico e sorológico, diferente do ELISA aqui padronizado.

3.11.4- Critérios de análise

Para a determinação da linha de corte (*cut-off*), a qual é um valor discriminatório entre a absorvância obtida nos controles positivos e negativos, foi utilizado um painel de 56 soros caracterizados como negativos por exame clínico, parasitológico e sorológico. O *cut-off* foi calculado a partir da média dos valores de DO das amostras negativas acrescido de três vezes o valor do desvio padrão destas amostras.

Os parâmetros sensibilidade, especificidade e valores preditivos foram estimados de acordo com Ferreira & Ávila (2001), utilizando uma tabela de entrada dupla relacionando o diagnóstico da doença e o resultado do teste, empregando o programa WIN EPISCOPE 2.0 (De Blas *et al.*, 2000). Os respectivos intervalos de confiança (IC), com grau de confiança 95% dos testes foram calculados de acordo com De Blas (2000).

A sensibilidade (S) do teste é dada pela porcentagem de positivos detectados pelo teste entre os indivíduos sabidamente doentes (verdadeiros positivos – VP). A especificidade (E), pela porcentagem de negativos, entre indivíduos não doentes (verdadeiros negativos – VN). Um resultado falso positivo (FP) acontece quando a amostra é sabidamente negativa, porém apresentou resultado positivo no teste. Já um resultado falso negativo (FN) acontece quando a

amostra é sabidamente positiva, porém apresenta-se negativa no teste. O valor preditivo positivo (VPP) refere-se à probabilidade de ter a doença se o resultado for positivo, enquanto que o valor preditivo negativo (VPN) refere-se à probabilidade de não ter a doença quando o resultado for negativo (Lira, 2005). Esses parâmetros foram determinados através das seguintes fórmulas:

$$S = VP / (VP + FN)$$

$$E = VN / (FP + VN)$$

$$VPP = VP / (VP + FP)$$

$$VPN = VN / (FN + VN)$$

Os resultados foram arbitrariamente expressos em índices de reatividade (IR = DO amostra/DO *cut-off*). O índice de reatividade foi utilizado como forma de representar os resultados por servir para uniformizar as leituras e eventuais diferenças de placa para placa do teste. Os IRs foram representados em gráfico obtido pelo programa computacional *GraphPad Prism* versão 3.0. O critério de positividade adotado foi conforme descrito abaixo:

IR < 1 - negativo

1 < IR < 1,2 - indeterminado

IR > 1,2 - positivo

4 – RESULTADOS

Os resultados apresentados abaixo dizem respeito à expressão, seleção, purificação e caracterização físico-química, química e imunológica das proteínas recombinantes, Lc9 e Lc13, de *Leishmania chagasi*. Como também ao ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado com as duas proteínas recombinantes individualmente.

4.1- Proteína recombinante de *Leishmania chagasi*: Lc9

4.1.1- Eletroforese em gel de agarose

O plasmídeo enviado pelo CPqGM/BA FIOCRUZ, relacionado à proteína Lc9, foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 4.1). A banda eletroforética concernente ao DNA plasmidial linear, isto é, clivado pela ação da enzima de restrição *BamHI* ou *KpnI*, contendo o inserto dos genes codificantes da proteína recombinante Lc9, indicou o peso molecular, equivalente a 4.300 pares de bases (raias 3 e 4) enquanto que o plasmídeo comercial pRSETB adquirido da Invitrogen, quando clivado com a enzima *BamHI*, mostrou um valor de cerca de 2.900 pares de bases (raia 2), portanto o inserto possui aproximadamente 1.400 pb, tomando-se como base um padrão de peso molecular em termos de número de pares de bases (raia 1), simultaneamente, submetido à eletroforese.

4.1.2- Expressão da proteína

A verificação da expressão da proteína recombinante Lc9 foi feita por eletroforese descontínua desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (Figura 4.2). Por este experimento verificou-se que as amostras provenientes do cultivo de *E.coli* transformada após indução por IPTG mostraram bandas eletroforéticas com PM aproximado de 46000 relativas a Lc9 (raias 2 e 3, ver seta). No caso, estas bandas foram mais intensas do que aquelas de mesma mobilidade eletroforética observadas nas amostras de cultivo antes da indução (raias 4 e 5).

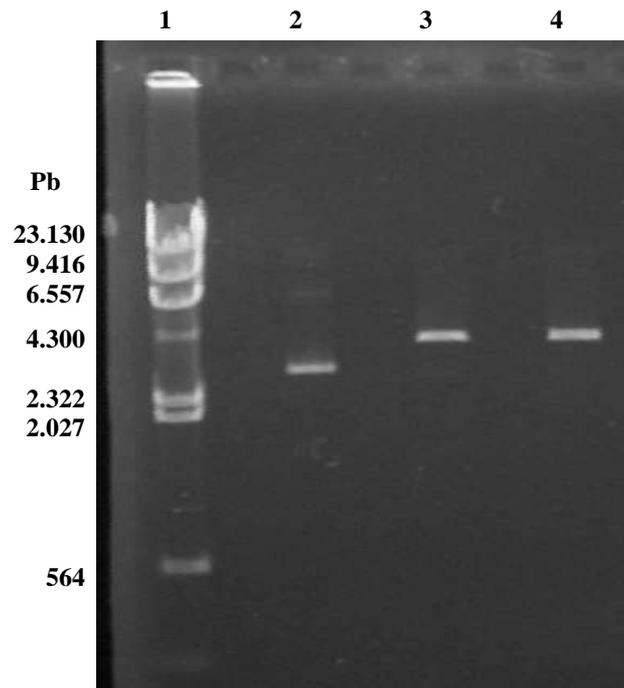


Figura 4.1: Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo codificante da proteína Lc9. Raia 1 - padrão de fragmentos de DNA com variação de PM em termos de número de pares de bases na faixa de 23.130 a 564; raia 2 - plasmídeo pRSETB “vazio” (ausência do inserto codificante da proteína Lc9) linearizado; raias 3 e 4 plasmídeo pRSETB contendo o gene codificante da proteína Lc9, digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *KpnI*, respectivamente.

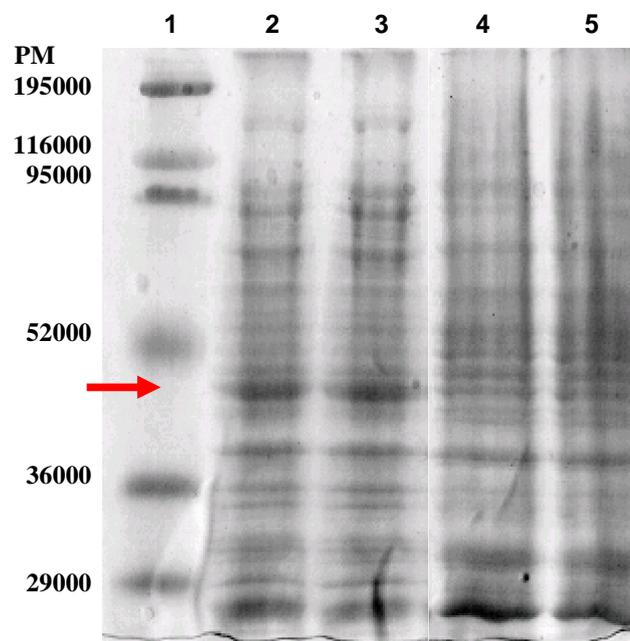


Figura 4.2: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida da proteína recombinante Lc9. Raia 1 - padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa de 195000 a 29000); raias 2 e 3 - lisado de *E. coli* transformada com plasmídeo pRSETB/Lc9 induzida com IPTG por 4 horas e raias 4 e 5- lisado de *E. coli* obtida antes da indução com IPTG. A seta indica a banda referente a expressão da proteína Lc9.

4.1.3- Purificação e análise de homogeneidade da proteína

Após a ruptura celular, o sobrenadante contendo a proteína recombinante Lc9, foi submetido a cromatografia de afinidade por níquel com a resina NI-NTA (Qiagen) conforme observado na figura 4.3.

A análise eletroforética da fração eluída da coluna de afinidade IMAC (18 mL – 24 mL, figura 4.3) mostrou uma banda eletroforética intensa, correspondente a proteína recombinante Lc9 situada na faixa de PM entre 58.000 a 38.000 (raias 6 e 7, ver seta, figura 4.4).

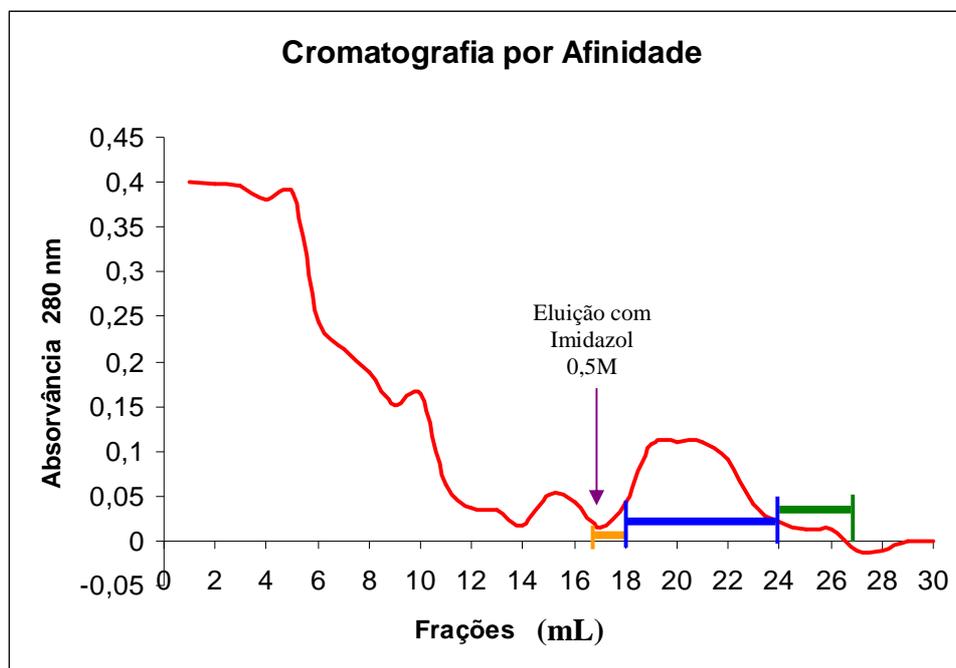


Figura 4.3: Cromatografia de afinidade por metal imobilizado da fração solúvel de *E.coli* submetido a lise celular contendo Lc9. A eluição foi, inicialmente, feita com a solução tampão fosfato de sódio 20 mM NaCl 150 mM, pH 8,0 após 17 mL seguida pela eluição com a mesma solução tampão contendo Imidazol 500 mM, pH 8,0. A faixa em laranja indica a fração coletada no momento em que o Imidazol foi adicionado na coluna. A faixa em azul indica o conjunto das frações onde a Lc9 foi eluída (18 a 24 mL) e a faixa em verde indica o final da eluição da Lc9 (24 a 27 mL).

As frações (18-24 mL e 24-27 mL) provenientes da eluição da coluna de afinidade e contendo a proteína Lc9 foram reunidas, dialisadas e submetidas à cromatografia em Sephadex G-25, a fim de retirar-se o excesso de Imidazol. Após esta etapa, as frações foram concentradas e

submetidas à cromatografia de exclusão e peneiração molecular (SEC) em coluna de Superdex 200 HR10/30. Dois picos principais foram observados e denominados de F4+F5 e F9+F10, seguindo a ordem de eluição (Figura 4.5). Através da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 12%, destes dois picos principais, observou-se que a proteína recombinante Lc9 estava presente nas frações F4 e F5 (Figura 4.6, raias 3 e 4, ver seta).

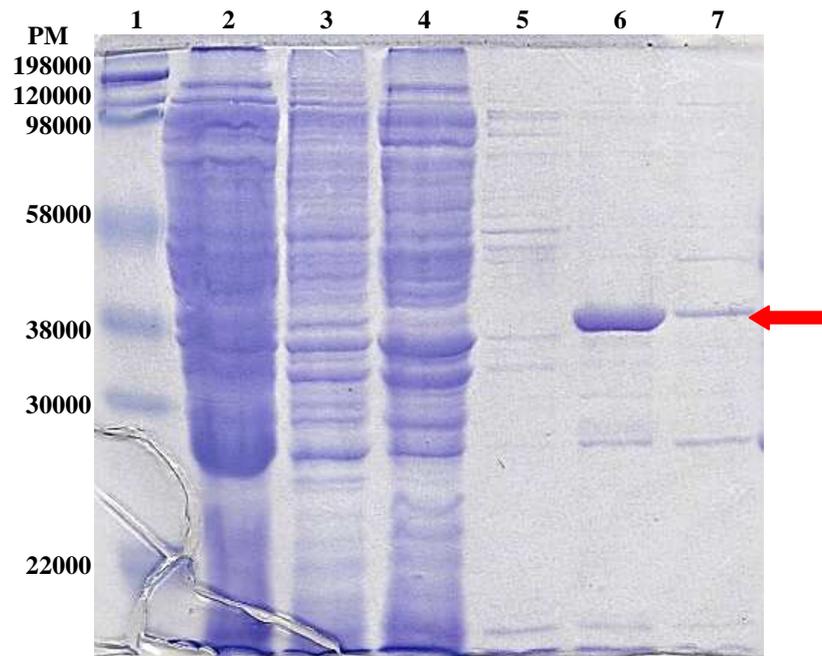


Figura 4.4: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida das frações eluídas da cromatografia por afinidade da proteína Lc9 (Figura 14). Raia 1 - padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa de 198000 a 22000); raias 2 e 3 - extratos brutos celulares aplicados em concentrações diferentes (concentrado e diluído 5X, respectivamente); raia 4 - material de exclusão (void) da coluna de afinidade e raias 5, 6 e 7 correspondem às frações eluídas após adição do imidazol 0,5 M, a saber: 17-18 mL; 18-24 mL e 24-27 mL (Figura 4.3), respectivamente. A seta indica a proteína Lc9 purificada por IMAC.

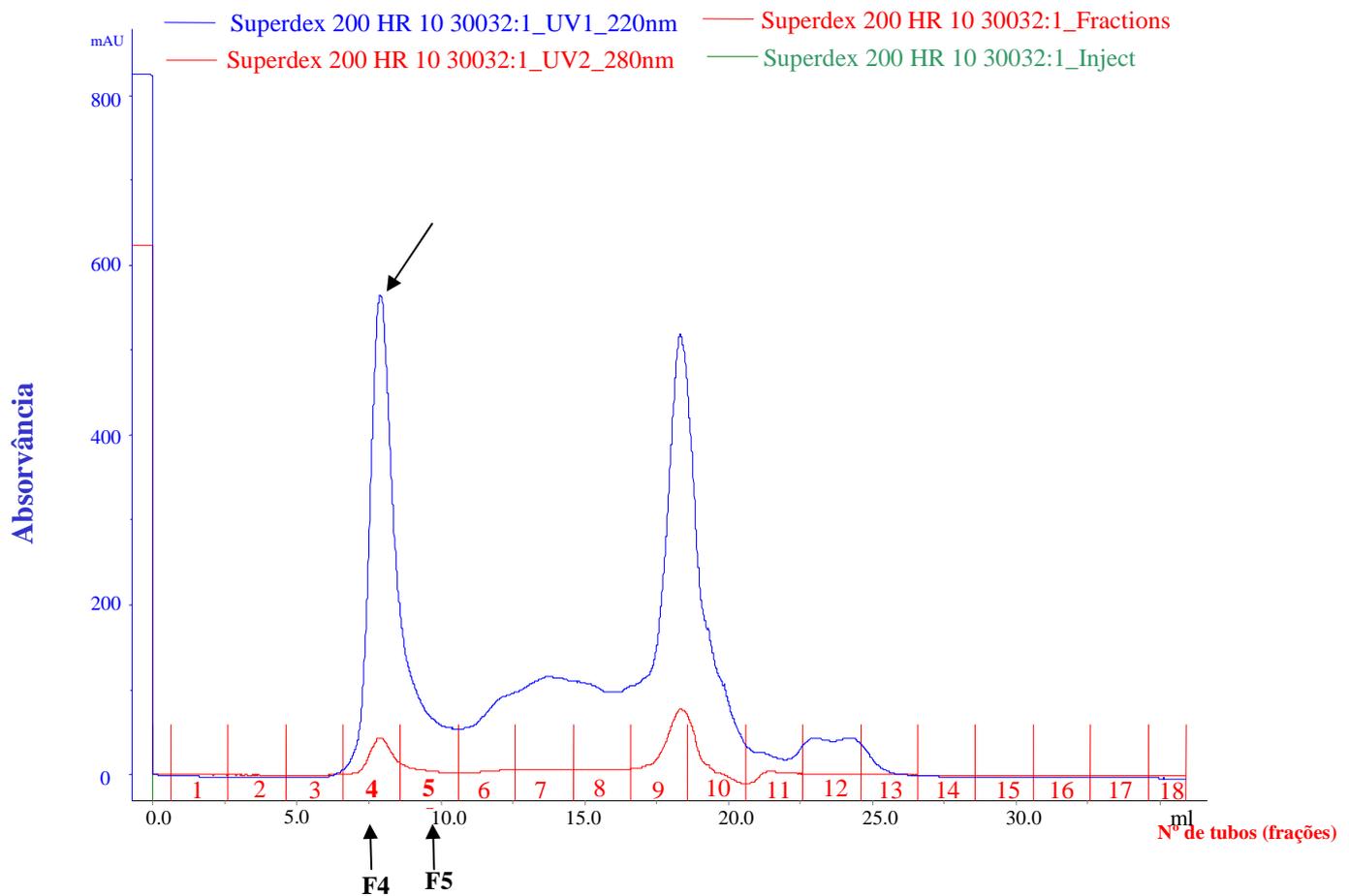


Figura 4.5: Cromatografia de exclusão e peneiração molecular em coluna Superdex 200 HR 10/30 da fração contendo a proteína Lc9 isolada da cromatografia de afinidade. A seta indica o pico que corresponde a Lc9 conforme dados da SDS-PAGE 12 % (Figura 4.6).

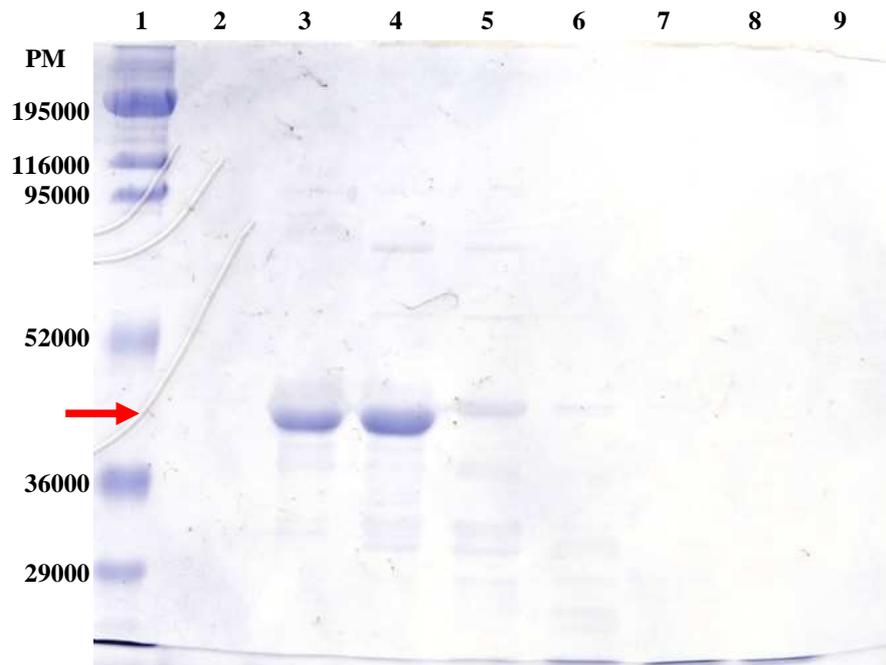


Figura 4.6: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida das frações isoladas da cromatografia de exclusão e peneiração molecular da proteína Lc9. Raia 1 - padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos; raia 2 – tubo ou fração 3, raias 3 e 4 - frações 4 e 5, respectivamente e raias 5 a 9 - frações 6 a 10, respectivamente. A seta indica a Lc9 após purificação por SEC.

As frações F4 e F5 eluídas da Superdex 200 foram reunidas e liofilizadas. O extrato bruto e as frações resultantes das etapas de purificação (IMAC e SEC) podem ser vistos na figura 4.7. A fração final foi confirmada como sendo a Lc9 e a sua homogeneidade foi avaliada por PAGE-SDS-Tricina 10%; uma banda principal com PM estimado de 48.000 (ver seta) foi detectada (Figura 4.8).

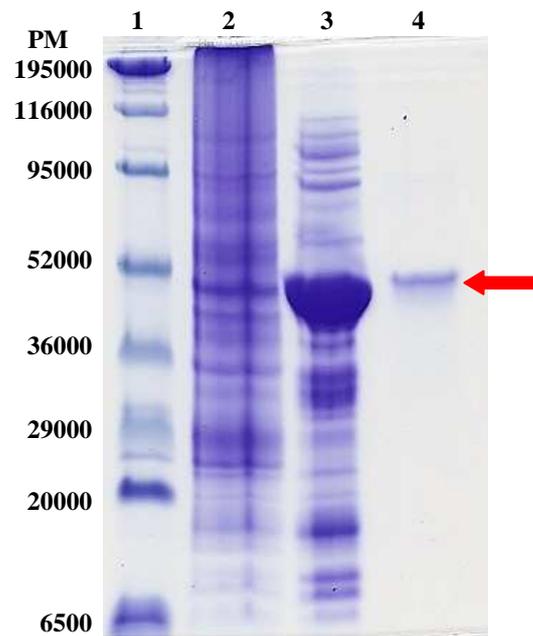


Figura 4.7: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida da fração solúvel de *E.coli* submetida a lise celular e frações relacionadas à proteína Lc9. Raia 1 – Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos, raia 2 – extrato bruto celular, raia 3 – *Pool* de frações obtidas da cromatografia de afinidade (IMAC) e raia 4 – Fração obtida da cromatografia de exclusão e peneiração molecular (SEC).

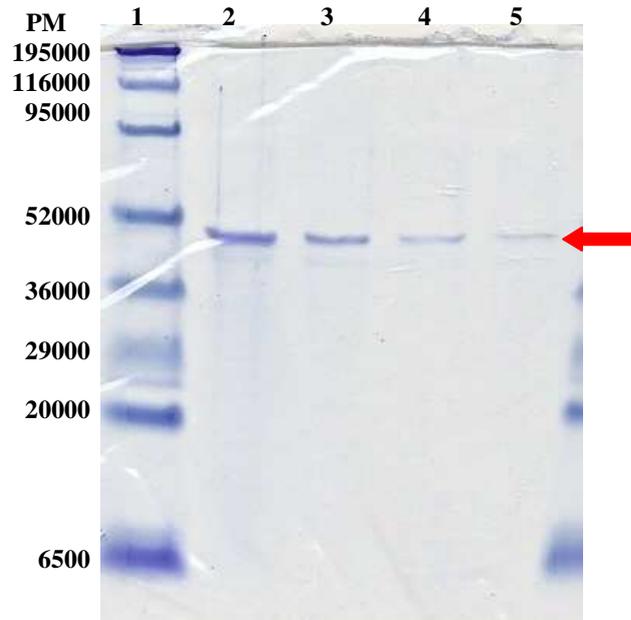


Figura 4.8: Eletroforese descontínua desnaturante em gel de poliacrilamida da proteína Lc9 purificada. Raia 1 – Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos e raias 2 a 5 – Concentrações diferentes de Lc9 (0,7mg/mL; 0,35mg/mL; 0,175 mg/mL e 0,0875mg/mL), respectivamente.

4.1.4- Quantificação protéica

A dosagem espectrofotométrica, referente ao método Folin-Lowry modificado, foi realizada para acompanhar o processo de purificação. A concentração final estimada para a proteína recombinante Lc9, foi de 0,7 mg/mL, sendo recuperada a massa de 10,5 mg (ver tabela 4.1).

Tabela 4.1: Etapas usadas no isolamento da proteína Lc9 e suas concentrações.

Etapas	Concentração (mg/mL)	Volume total (mL)	Massa total (mg)
Extrato bruto	19,27	50	963,5
Após IMAC	3,34	45	150,0
Após Sephadex G-25	2,46	40	98,4
Após Superdex 200	0,70	15	10,5

4.1.5- Caracterização físico-química da proteína

- Determinação do ponto isoelétrico por Focalização Isoelétrica em gel de poliacrilamida

Pela focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida a 7%, usando-se um gradiente de pH de 3-9, a fração contendo a Lc9 apresentou dois pontos isoelétricos (pI), um com pI de 6,43 (pico 1) e outro com pI de 3,99 (pico 2), quando analisada pelo programa computacional *Image Master* (Figura 4.9). A estimativa do pI foi feita em relação a uma curva de calibração realizada com padrões de pI conhecidos (Figura 4.10).

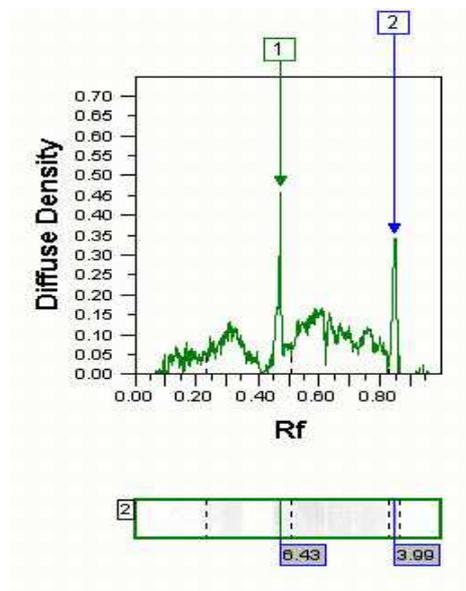
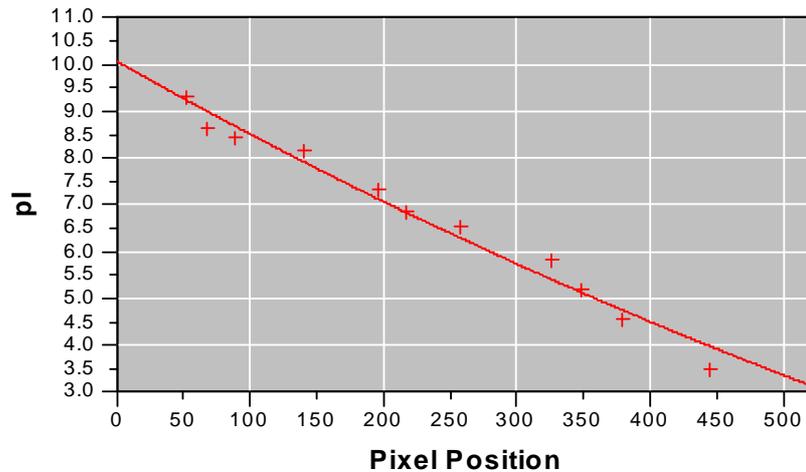


Figura 4.9: Eletroforetograma e análise densitométrica da focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida da fração Lc9 purificada (pico 1) por dois processos cromatográficos. Ponto isoelétrico estimado através da curva de padrão de pI (ver figura 4.10). O Rf refere-se a unidade de mobilidade.



Log curve
 $y = 20.88e^{-7.75E-004x} - 10.81$
 R^2 Value: 0.9757

Figura 4.10: Curva de calibração para determinação de pontos isoelétricos (pI) feita a partir da corrida eletroforética de padrões de proteínas de pI conhecidos em gel de poliacrilamida. Padrão *broad* de pI de proteínas (GE Healthcare): Amilglicosidase – 3,5; Vermelho de metila (corante não protéico) – 3,75; Inibidor de tipinina – 4,55; β -lactoglobulina A – 5,20; Anidrase Carbônica bovina – 5,85; Anidrase carbônica humana – 6,55; mioglobina de cavalo – 7,35; Lectinas – 8,15, 8,45 e 8,65 e tripsinogênio – 9,30.

- Determinação de peso molecular

O peso molecular nativo determinado para a fração protéica Lc9 purificada foi estimado, em cerca de 550.000 a partir de dados inerentes a sua eluição em uma coluna de Superdex 200 previamente calibrada com padrões protéicos de pesos moleculares conhecidos (Figura 4.11). Os dados obtidos são mostrados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Peso molecular estimado da proteína recombinante Lc9.

Proteínas	Ve/V0	PM	log PM	Kav
Tiroglobulina	1,148	669.000	5,825	0,055
Ferritina	1,308	440.000	5,643	0,117
Catalase	1,503	200.000	5,301	0,191
BSA	1,629	67.000	4,826	0,239
Ovalbumina	1,767	43.000	4,633	0,291
Anidrase Carbônica	1,905	29.000	4,462	0,344
Lc9	1,220	549.540	5,742	0,083

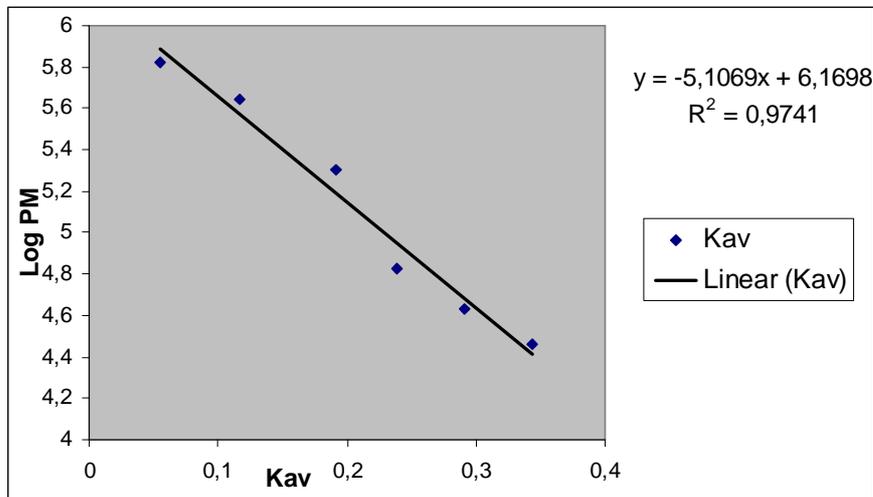


Figura 4.11: Curva de calibração feita a partir da eluição de proteínas padrões de pesos moleculares conhecidos na coluna de exclusão e filtração molecular em Superdex 200.

- Caracterização Imunoquímica por *Western Blot*

A análise da fração Lc9 feita por *Western Blot*, isto é, SDS-PAGE seguida de eletrotransferência e imunorevelação, mostrou duas bandas reveladas através de reação com o soro de cão naturalmente infectado por *Leishmania* (Figura 4.12, raia 2). A principal delas, ou melhor, aquela que apresentou maior intensidade de cor, correspondeu a um peso molecular de, aproximadamente, 44.000 quando comparado com a migração de proteínas padrões de PM conhecidos pré-coradas, igualmente eletrotransferido. A outra banda correspondeu a um polipeptídeo cujo PM estimado foi da ordem de 38000. Ainda por este experimento foi

constatado que nenhuma banda foi detectada nas fitas incubadas com soro de cão controle negativo para leishmaniose (raia 4).

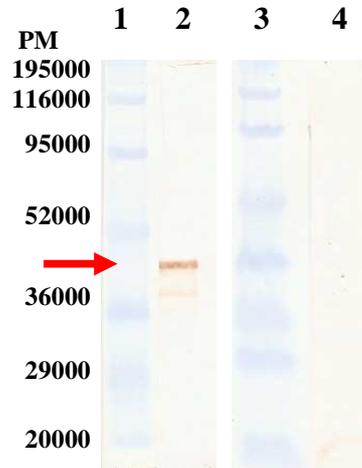


Figura 4.12: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de tricina seguido de imunorevelação após eletrotransferência para membrana de nitrocelulose (*Western blot*) da proteína Lc9 purificada. Raias 1 e 3 - proteínas padrões de pesos moleculares conhecidos; raia 2 - Lc9 incubada com soro de cão positivo para leishmaniose e raia 4 - Lc9 incubada com soro de cão controle negativo para leishmaniose. A seta indica a principal banda revelada.

4.2- Proteína recombinante de *Leishmania chagasi*: Lc13

4.2.1- Eletroforese em gel de agarose

O plasmídeo enviado pelo CPqGM/BA FIOCRUZ relacionado a proteína Lc13, foi analisado por eletroforese em gel de agarose (Figura 4.13). A banda eletroforética referente ao DNA plasmidial linearizado, isto é, clivado pela ação das enzimas de restrição *BamHI* ou *XhoI*, contendo o inserto que codifica a proteína recombinante Lc13, indicou o peso molecular, equivalente a 6.000 pares de base (raias 2 e 3) tomando-se como base um padrão de peso molecular em número de pares de bases do DNA (raia 1). O plasmídeo comercial pBK-CMV adquirido da Stratagene, apresenta cerca de 4.500 pb, portanto o inserto possui aproximadamente 1.500 pb.

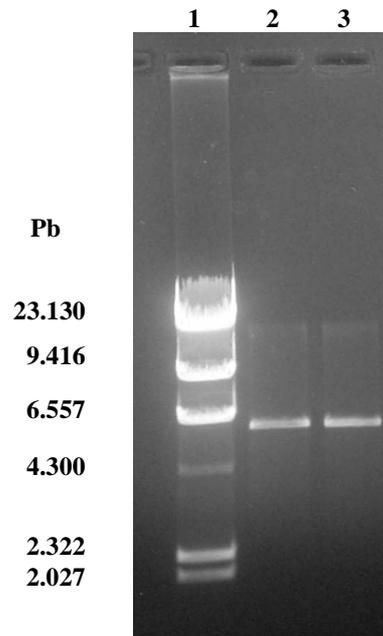


Figura 4.13: Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo linear codificante da proteína Lc13. Raia 1 - padrão fragmentos de DNA com variação de PM em termos de número de bases na faixa de 23.130 a 564; raias 2 e 3 - pBK-CMV contendo o gene codificante da proteína Lc13, digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI*, respectivamente.

4.2.2- Expressão de proteína

A expressão da proteína recombinante Lc13, é desprovida de hexapeptídeo de histidina e produzida como corpo de inclusão feita por SDS-PAGE, foi realizada da mesma forma da Lc9, ou seja, com indução por IPTG por 4 horas.

A proteína Lc13 é expressa na forma de corpo de inclusão. O tratamento feito com PMSF e lisozima gerou um sedimento, após centrifugação, que foi lavado com a solução tampão Tris HCl 50mM e novamente centrifugado. Os sobrenadantes obtidos após a lise foram guardados, para posterior análise em SDS-PAGE. O sedimento por sua vez, foi solubilizado com a solução tampão Tris HCl 50 mM contendo uréia 8 M, pH 8,0. A figura 4.14 mostra os dados relacionados ao sobrenadante (raia 1) e a fração solúvel obtida após o tratamento do sedimento com a uréia (raia 2). A seta mostrada na figura 4.14 indica a banda eletroforética correspondente à proteína Lc13, com PM aproximado de 88.000, que mostra uma intensidade muito grande na amostra tratada com o agente caotrópico (raia 3).

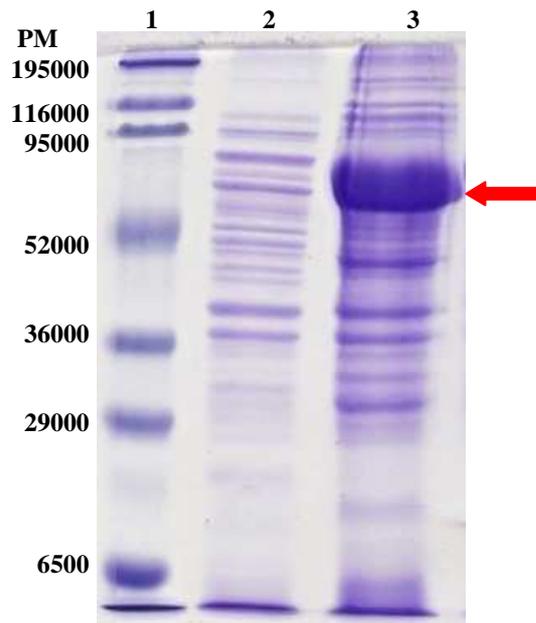


Figura 4.14: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, representando o teste de localização da proteína Lc13. Raia 1 - padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos; raia 2 - sobrenadante obtido a partir do sedimento de expressão e raia 3 - amostra referente ao mesmo sedimento lavado e tratado com uréia (desnaturado). A seta indica a proteína super-expressa.

4.2.3- Purificação e análise da homogeneidade da proteína

Após a ruptura celular, o extrato bruto, contendo a Lc13 solubilizada com solução de uréia concentrada, foi submetido à cromatografia de perfusão de troca aniônica (IEX) em coluna Poros HQ. Das frações observadas na figura 4.15, apenas a fração 2 que corresponde ao pico principal a 220 nm, apresentou banda eletroforética com peso molecular próximo ao esperado para a Lc13.

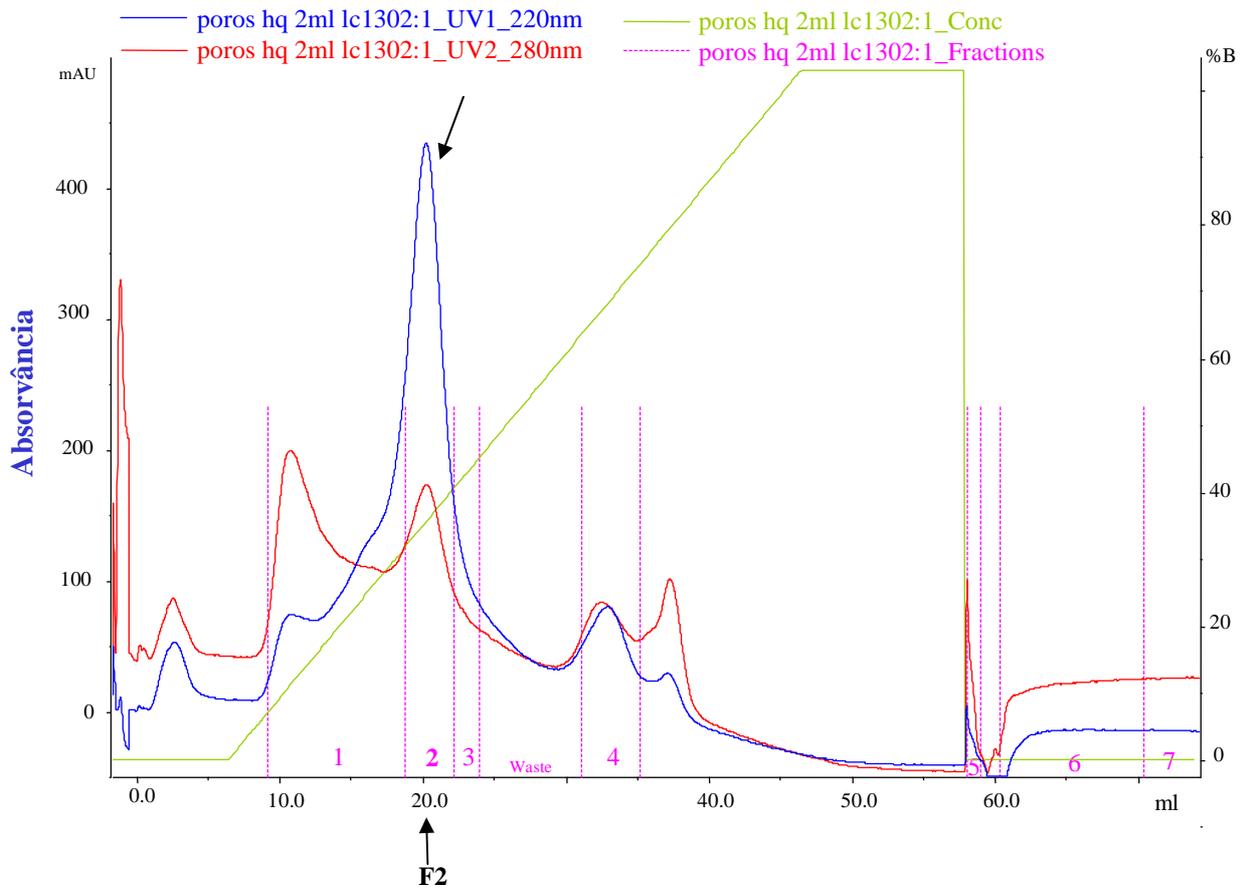


Figura 4.15: Cromatografia de troca aniônica (Poros HQ) dos corpúsculos de inclusão contendo a proteína Lc13, solubilizados com uréia. Os picos em azul, mostram a absorvância a 220 nm e em vermelho a 280 nm. Em verde, está representado o gradiente salino. A seta indica a fração em que a Lc13 foi eluída.

A fração F2, referente à Lc13, eluída da coluna Poros HQ, foi reunida e liofilizada. O *pool* das frações contendo a proteína Lc13, obtidas na IEX, foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida Tricina 10% em concentrações diferentes para avaliação da homogeneidade da proteína (Figura 4.16, ver seta).

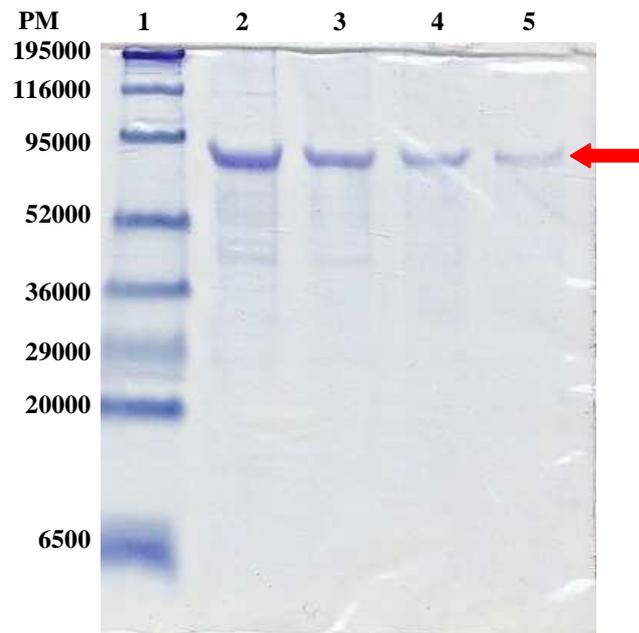


Figura 4.16: Eletroforese da proteína Lc13 parcialmente purificada (cromatografia de troca iônica). Raia 1 - Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos, raia 2 a raia 5 – Concentrações diferentes de Lc13 (3,6mg/mL; 1,8mg/mL; 0,9 mg/mL e 0,45mg/mL, respectivamente). A seta indica a Lc13 parcialmente purificada.

4.2.4- Quantificação protéica

A concentração final estimada para a proteína recombinante Lc13, pela dosagem espectrofotométrica usando-se o método Folin-Lowry, foi de 3,6 mg/mL, sendo no caso recuperada a massa de 18 mg (ver tabela 4.3).

Tabela 4.3: Etapas usadas no isolamento da proteína Lc13 e suas concentrações.

Etapas	Concentração (mg/mL)	Volume (mL)	Massa total (mg)
Extrato Bruto	18,6	40	744
Após troca iônica e liofilização	3,6	5	18
Concentração final	3,6	5	18

4.2.5- Caracterização físico-química da proteína

- Determinação do ponto isoelétrico por Focalização Isoelétrica em gel de poliacrilamida

Pela focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida a 7%, usando-se um gradiente de pH de 3-9 e padrões de pI conhecidos (Figura 4.10 mostrada anteriormente), a Lc13 apresentou ponto isoelétrico de 6,42 quando analisada pelo programa *Image Master* (Figura 4.17).

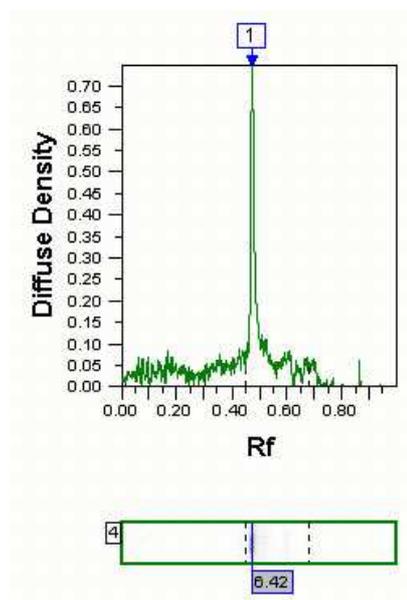


Figura 4.17: Eletroforetograma e análise densitométrica da focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida da fração Lc13 purificada. Ponto isoelétrico estimado através da curva de padrão de pI (figura 4.10).

- Determinação de peso molecular

O peso molecular nativo determinado para a fração protéica Lc13 purificada (F2) foi estimado, aproximadamente, em 282.000 a partir de dados inerentes a sua eluição. Esta foi feita da mesma forma que para a Lc9, em uma cromatografia de exclusão e peneiração molecular em coluna Superdex 200 e com a eluição de padrões protéicos de pesos moleculares conhecidos. Seguindo o mesmo modelo da tabela 4.2, os valores para V_e/V_0 , PM, \log PM e K_{av} da proteína Lc13, foram 1,38; 281.838; 5,45 e 0,14, respectivamente.

- Caracterização Imunoquímica por *Western Blot*

A análise da fração Lc13 (F2) feita pela técnica de *Western Blot*, isto é, SDS-PAGE seguido de imunorevelação mostrou duas bandas reveladas através de reação com o soro de cão naturalmente infectado por *Leishmania* (Figura 4.18, raia 2, ver seta). A principal delas, ou melhor, aquela que apresentou maior intensidade de cor, correspondeu a um peso molecular de, aproximadamente, 80000 quando comparado com a migração de proteínas padrões de PM conhecidos pré-coradas, igualmente eletrotransferido, A outra banda correspondeu a um polipeptídeo cujo PM estimado foi da ordem de 40.000. Ainda por este experimento foi constatado que nenhuma banda foi detectada nas fitas incubadas com soro de cão controle negativo para leishmaniose (raia 4).

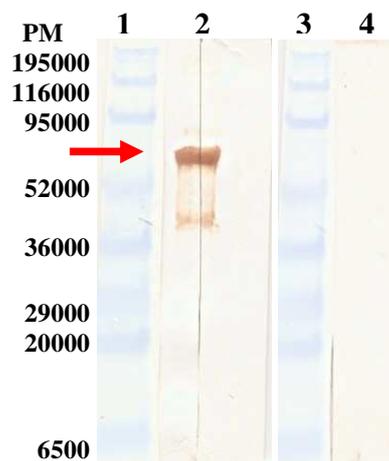


Figura 4.18: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida tricina seguido de imunorevelação após eletrotransferência para membrana de nitrocelulose (*Western blot*) da proteína Lc13 purificada. Raias 1 e 3 - padrões de proteínas de pesos moleculares conhecidos; raia 2 - Lc13 incubada com soro de cão naturalmente infectado por *Leishmania* e raia 4 - Lc13 incubada com soro de cão controle negativo para leishmaniose. A seta indica a principal banda revelada.

4.3 - Padronização do ensaio imunológico com os antígenos protéicos Lc9 e Lc13

4.3.1- Avaliação do anticorpo secundário quanto à concentração de peroxidase e de IgG

Os produtos da conjugação, obtidos a partir de três concentrações diferentes de metaperiodato (NaIO_4) empregadas, foram avaliados de acordo com a relação molar HRP/IgG e quanto à atividade enzimática. Para isso, foram utilizados os valores obtidos para as absorvâncias a 403 nm e a 280 nm que estão apresentados na tabela 4.4. Considerando os valores de PM de IgG (150.000) e de HRP (44.000), determinou-se a concentração de HRP e IgG, bem como a razão molar entre estas proteínas, no material conjugado conforme mostrado na tabela 4.5.

Tabela 4.4: Valores de absorvâncias determinadas a 403 nm e a 280 nm para os produtos conjugados.

Conjugado	$A_{403\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$
1	0,634	1,494
2	0,589	1,575
3	0,435	1,511

Conjugado 1: Anti-cão-HRP (0,05M NaIO_4); conjugado 2: Anti-cão-HRP (0,1M NaIO_4) e conjugado 3: Anti-cão-HRP (0,2M NaIO_4).

Tabela 4.5: Relação molar (HRP/IgG) obtida para as amostras conjugadas referentes a três concentrações diferentes de NaIO_4 .

Conjugado	[HRP] (mg/mL)	[IgG] (mg/mL)	HRP/IgG (M/M)
1	0,25	0,90	0,95
2	0,24	0,97	0,84
3	0,17	0,97	0,61

Os resultados obtidos para a atividade enzimática do conjugado preparado usando-se três concentrações diferentes de NaIO_4 são descritos na tabela 4.6.

Tabela 4.6:- Atividade enzimática do conjugado produzido

Conjugado	Atividade enzimática
1	0,102 mmol x mL ⁻¹ x min ⁻¹ .
2	0,075 mmol x mL ⁻¹ x min ⁻¹ .
3	0,057 mmol x mL ⁻¹ x min ⁻¹ .

Desta forma, foi selecionado o conjugado produzido a partir da reação com 0.05M de NaIO₄ para a ativação da enzima HRP, por apresentar a maior razão molar HRP/IgG e a maior atividade enzimática conforme mostrado nas tabelas 4.5 e 4.6. A concentração final do conjugado bruto foi de 0,92 mg/mL.

4.3.2- Padronização do ensaio imuno-enzimático (ELISA)

Na padronização do ELISA buscou-se a melhor concentração do antígeno recombinante em conjunto com a melhor diluição do conjugado. Os gráficos abaixo evidenciam os dados obtidos na padronização do teste de ELISA para o diagnóstico de leishmaniose, utilizando-se os antígenos Lc9 e Lc13, frente a soros caninos positivos (Figuras 4.19 e 4.21) e soros caninos negativos (Figuras 4.20 e 4.22). A partir da análise global dos gráficos (absorvâncias de valor próximo a 1,0 – soro positivo e igual ou menor a 0,1 – soro negativo) foram selecionadas as concentrações de 300 ng para ambos antígenos (ver setas indicativas) e diluições do conjugado de 1:10.000 v/v (Lc9) e 1:20.000 v/v (Lc13), a partir de sua concentração original de 0,92 mg/mL.

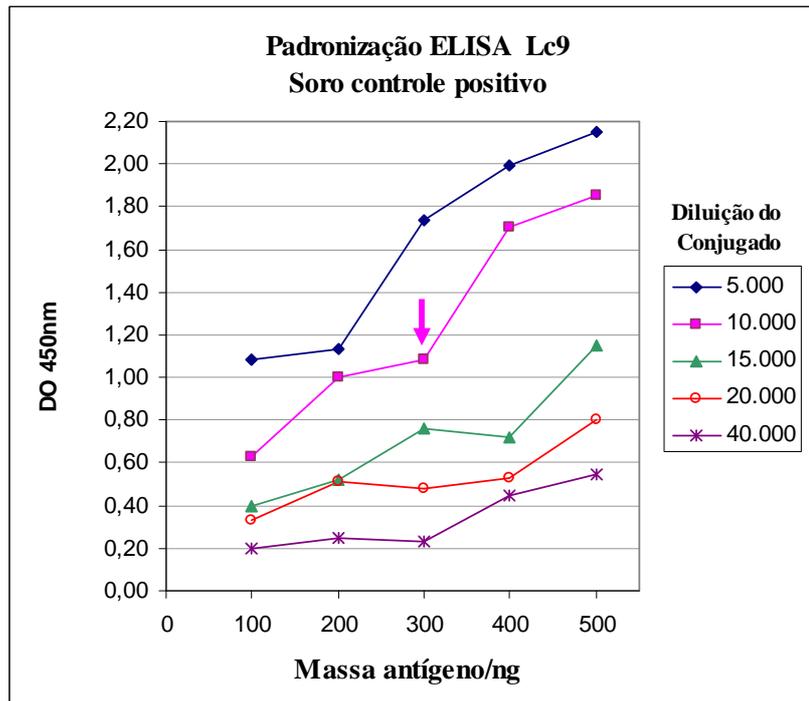


Figura 4.19: Análise dos valores de absorvâncias frente à amostra de soro de cão controle positivo para leishmaniose reativo a proteína Lc9. A seta indica a concentração de antígeno Lc9 e o título (diluição) do conjugado selecionados (300 ng e 10.000, respectivamente).

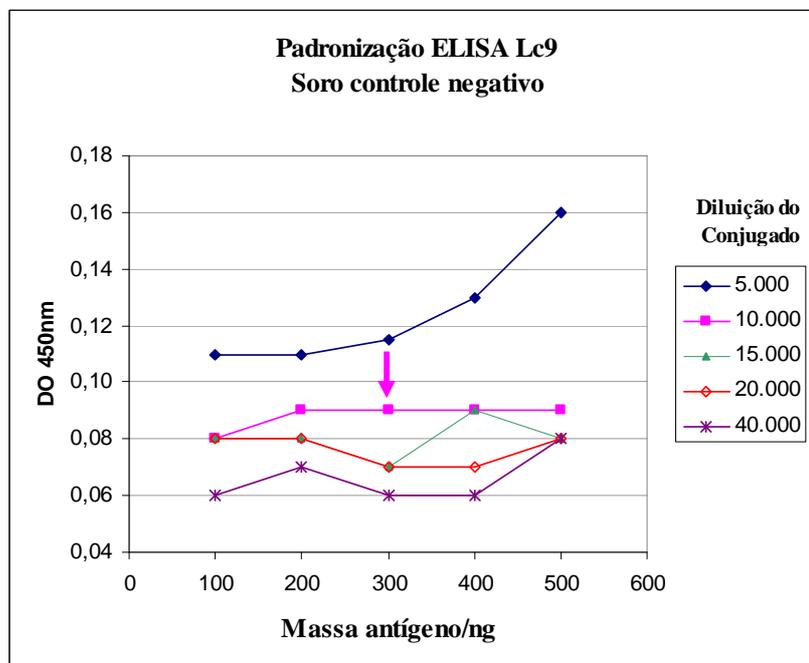


Figura 4.20: Análise dos valores de absorvância frente à amostra de soro de cão controle negativo para leishmaniose com a proteína Lc9. A seta indica a concentração de antígeno Lc9 e o título (diluição) do conjugado selecionados (300 ng e 10.000, respectivamente).

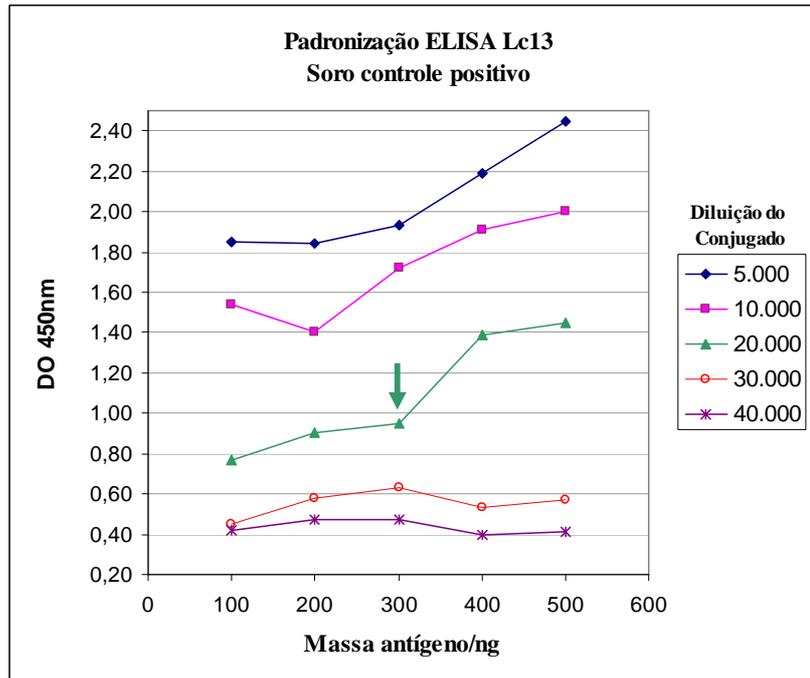


Figura 4.21: Análise dos valores de absorvância frente à amostra de soro de cão controle positivo para leishmaniose relativo a proteína Lc13. A seta indica a concentração de antígeno Lc13 e o título (diluição) do conjugado selecionados (300 ng e 20.000, respectivamente).

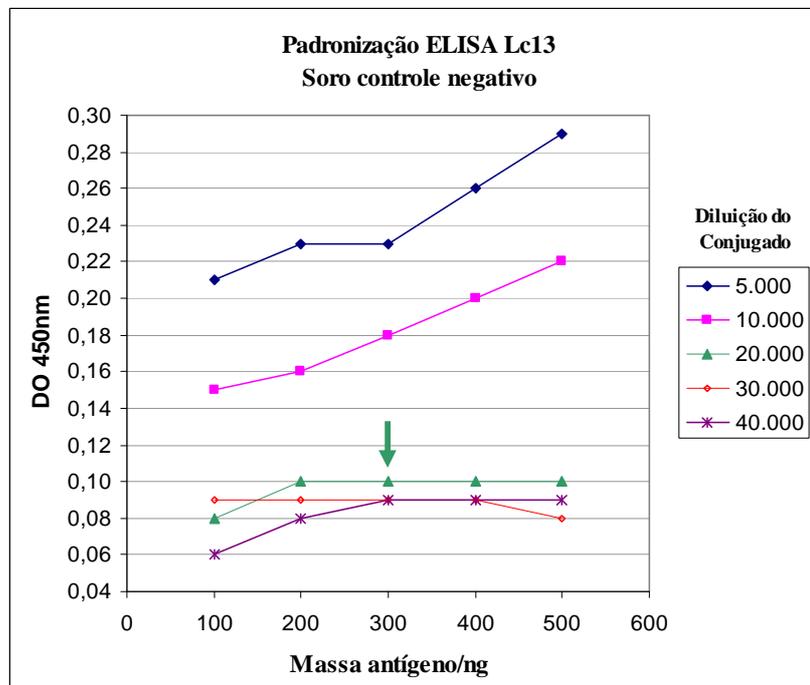


Figura 4.22: Análise dos valores de absorvância frente à amostra de soro de cão controle negativo para leishmaniose com a proteína Lc13. A seta indica a concentração de antígeno Lc13 e o título (diluição) do conjugado selecionados (300 ng e 20.000, respectivamente).

4.3.3- Determinação da linha de corte (*cut off*)

A linha de corte (*cut-off*) foi determinada a partir de um painel de 56 soros sabidamente negativos para leishmaniose canina, isto é, de cães caracterizados por exame clínico, parasitológico e sorológico por RIFI e ELISA (com antígenos naturais, diferente do aqui testado). Perante este painel foram estabelecidas as linhas de corte (Figura 4.23, linhas em vermelho) para os antígenos recombinantes individualmente. Os valores das linhas de corte (média + 3 desvios-padrão) calculados foram de 0,26 (Lc9), e 0,28 (Lc13).

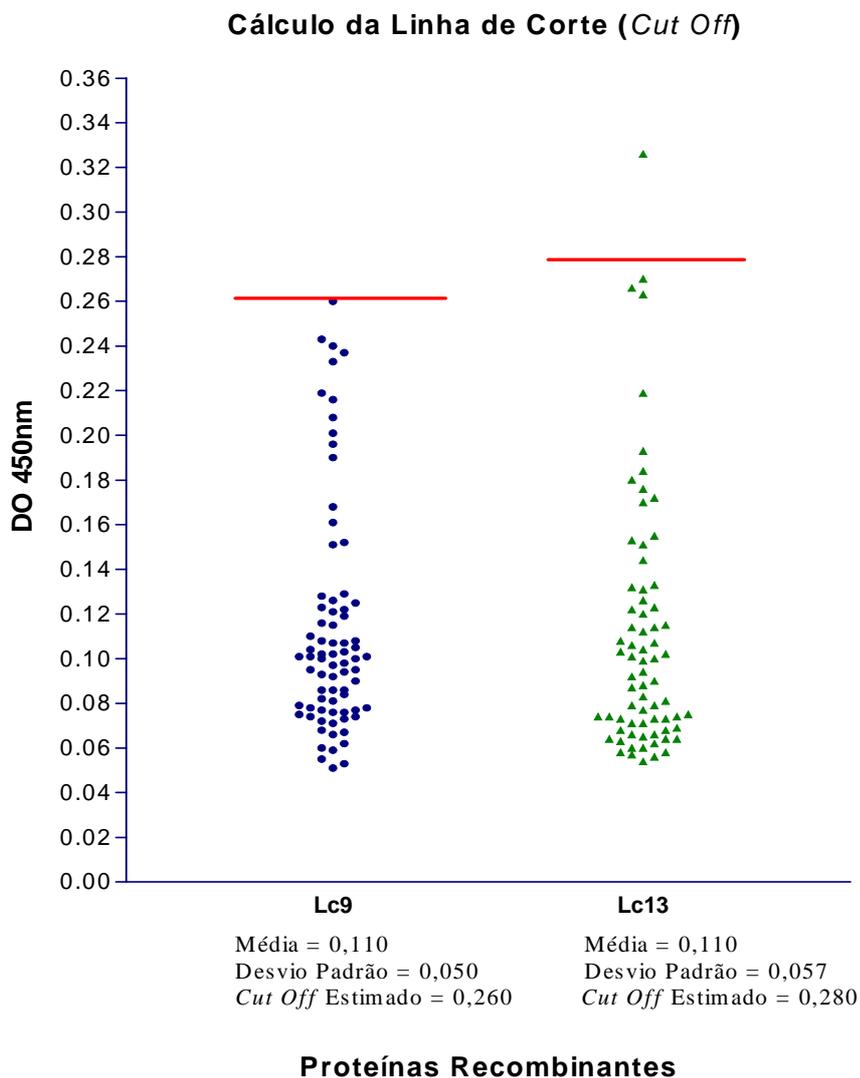


Figura 4.23: Análise dos valores de absorvância a 450 nm dos soros caninos negativos para leishmaniose, usados na obtenção do cálculo da linha de corte. Em vermelho é mostrada cada uma das linhas de corte para as proteínas recombinantes (Lc9 e Lc13).

4.3.4- Desempenho do ensaio

Após a definição da linha de corte (*cut-off*), as proteínas alvo, Lc9 e Lc13 foram desafiadas em um imuno-ensaio ELISA perante a um painel de 138 soros de cães com infecção natural por *Leishmania* e 119 soros de cães negativos para a leishmaniose, totalizando 257 soros, todos caracterizados por diagnóstico clínico, parasitológico e sorológico. O mesmo painel de soros foi testado para as duas proteínas, sob as mesmas condições. Os dados obtidos através das leituras de absorvâncias a 450 nm foram transformados em valores de índice de reatividade (IR) (Figura 4.24). Os resultados com IR menores que 1,0 foram considerados negativos enquanto aqueles com valores superiores a 1,2 foram considerados positivos. As amostras que apresentaram valores de IR entre 1,0 e 1,2 (20% acima do limite para IR negativo), foram consideradas indeterminadas, por estarem na zona de segurança.

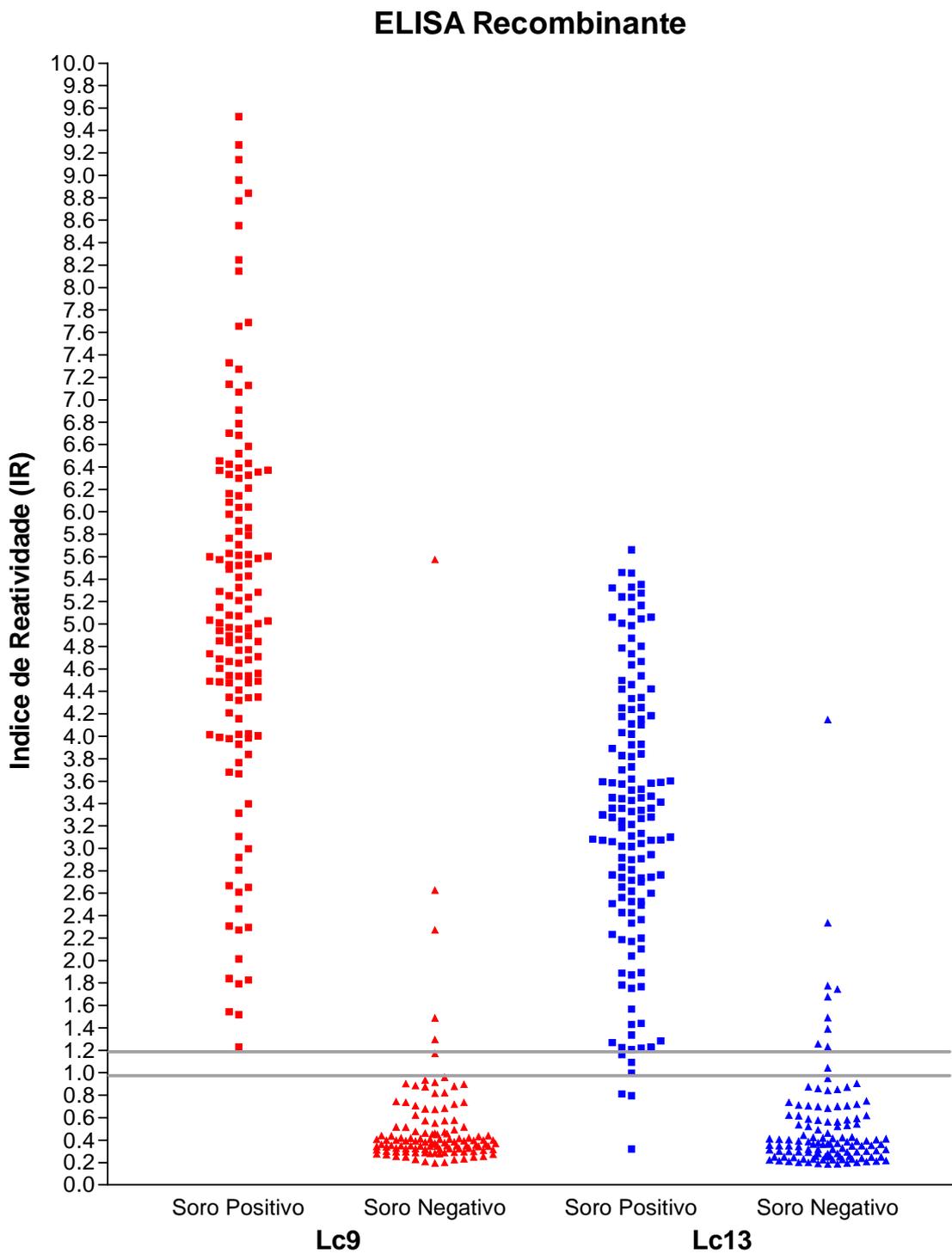


Figura 4.24: Valores de índice de reatividade, obtidos a partir da razão entre a DO do soro e a DO do *cut-off* (ambas a 450 nm), de soros caninos diagnosticados parasitologicamente e testados no ensaio com proteínas Lc9 e Lc13. As linhas cinzas indicam o limiar de positividade das reações ($IE > 1,2$) e a zona de segurança do teste (IR entre 1,0 e 1,2).

Para os cálculos dos índices de sensibilidade e de especificidade, assim como os valores preditivos, a partir dos dados obtidos por ELISA para um número total de 257 amostras (138 positivas e 119 negativas) desafiadas com as duas proteínas recombinantes isoladas foi usado o programa estatístico *Win Episcopy* com um intervalo de confiança de 95%. As tabelas abaixo mostram os resultados da análise de sensibilidade, especificidade e os valores preditivos do ELISA com as proteínas recombinantes. O ensaio com a proteína recombinante Lc9 apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 95,0%, os VPP e VPN foram, respectivamente, 95,8% e 100% (Figura 4.25); enquanto que o ensaio com a proteína recombinante Lc13 apresentou uma sensibilidade de 95,7% e uma especificidade de 91,6% com VPP e VPN de 93% e 94,8%, respectivamente (Figura 4.26).

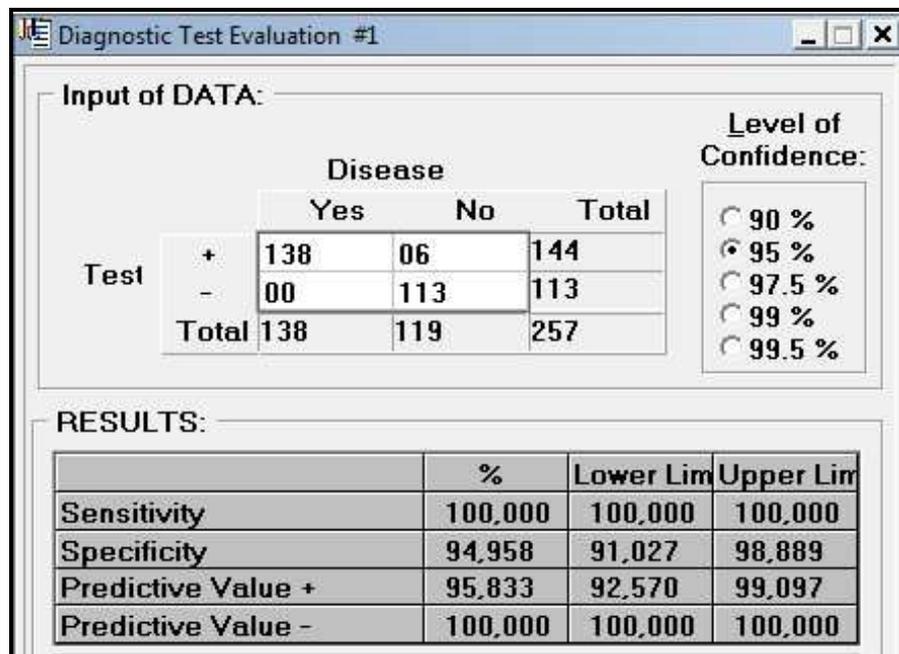


Figura 4.25: Valores estimados para os índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos para o ensaio com a proteína recombinante Lc9. Quadro obtido do programa *Win Episcopy* 2.0.

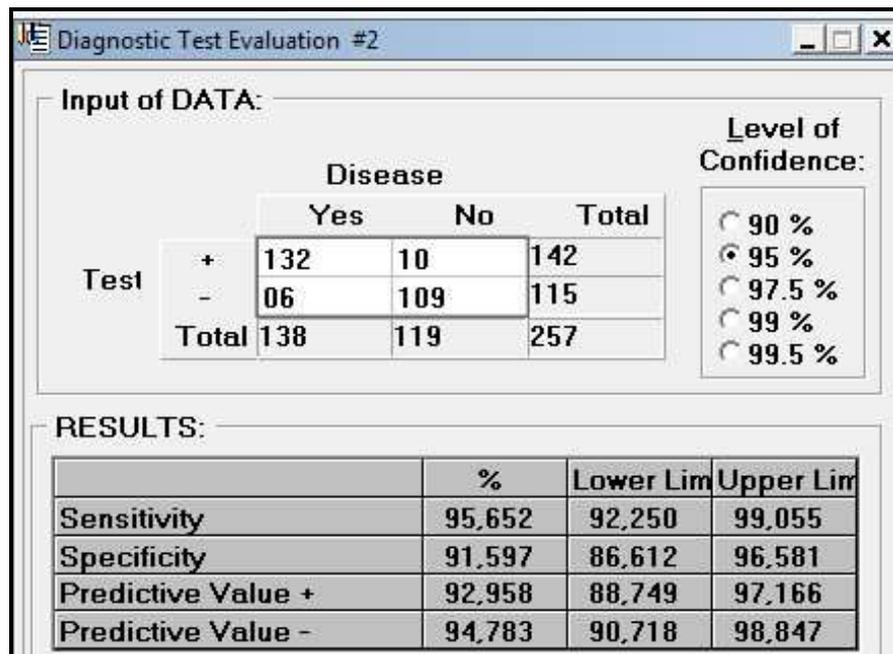


Figura 4.26: Valores estimados para os índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos para o ensaio com a proteína recombinante Lc13. Quadro obtido do programa *Win Episcope 2.0*.

5 – DISCUSSÃO

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante e das descobertas sobre promotores e repressores do genoma de *Escherichia coli* tornou-se possível o desenvolvimento da clonagem de genes de interesse e a manipulação da expressão de proteínas. O sistema de expressão de proteínas heterólogas em *Escherichia coli*, mais comumente usado, é baseado no *operon lac*. A indução da expressão é obtida pela adição de um análogo de lactose sintético e não degradável, o isopropil tio- β -D-galactosídeo (IPTG), o qual se associa a proteína repressora (LacI) e promove o desacoplamento dessa proteína do promotor, permitindo que a RNA polimerase realize a transcrição do gene de interesse (Sambrook *et al.*, 1989; 2001). Assim, a expressão de proteínas submetidas à clonagem tornou-se uma abordagem essencial para, por exemplo, a produção de proteínas alvo e a inserção gênica de uma cauda (*tag*) específica (p.ex. tetra ou hexapeptídeo de His) ao gene principal codificante, facilitando a purificação de proteínas através da cromatografia de afinidade. Esta tecnologia permite acelerar os estudos funcionais e estruturais das macromoléculas produzidas a partir da tecnologia do DNA recombinante utilizando plasmídeos bacterianos (Bugg *et al.*, 1994).

Neste trabalho, os plasmídeos contendo os genes codificantes de proteínas recombinantes de *Leishmania chagasi*, foram cedidos pelo Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção (CPqGM – FIOCRUZ). As proteínas Lc9 e Lc13, foram testadas como antígenos em um provável *kit* de imunodiagnóstico baseado em ELISA. Tal escolha foi baseada na avaliação da expressão gênica de dois diferentes plasmídeos contendo os antígenos protéicos de interesse. Inicialmente, este estudo, extensivo a um grupo maior de proteínas do referido protozoário, foi feito no aludido laboratório, culminando com a verificação da complexidade polipeptídica das proteínas produzidas e a estimativa de seus pesos moleculares por SDS-PAGE. Nossa competência foi reavaliar tais resultados e estendê-los a luz de nossas condições de cultivo celular, expressão gênica e purificação protéica determinantes da viabilidade do uso de Lc9 e Lc13 como possíveis antígenos para o diagnóstico sorológico por ELISA da leishmaniose canina.

5.1- Expressão e purificação das proteínas

Os plasmídeos pRSETB e pBK-CMV contendo os insertos relacionados às proteínas Lc9 e Lc13, respectivamente, após clivagens adequadas com enzimas de restrição forneceram, em cada caso, após análise eletroforética (Figuras 4.1 e 4.13), bandas polinucleotídicas com intensidades significativas e correspondentes com o número de bases nitrogenadas esperado para o plasmídeo com e sem inserto. As seqüências genéticas dos plasmídeos que codificam as proteínas Lc9 e Lc13 são maiores que a seqüência dos plasmídeos sem inserto. Desta forma, os plasmídeos estavam em condições apropriadas para serem usados nas transformações bacterianas.

Visando uma maior rapidez no processo de expressão gênica, inicialmente, produzimos lotes sementes de bactérias transformadas para armazenamento.

A expressão gênica das bactérias transformadas resultou em duas proteínas, sendo uma delas, Lc9, obtida na forma “solúvel” e outra obtida na forma “insolúvel”, Lc13. Esta última, recuperada na forma de um precipitado (sedimento), freqüentemente, denominado corpo de inclusão. A purificação da proteína recombinante Lc9 foi feita, inicialmente, por cromatografia de afinidade com a resina NI-NTA. Esta escolha aconteceu pelo fato da referida proteína possuir cauda de histidina (hexapeptídeo de histidina) na sua porção amino-terminal e tal peptídeo, por conta de suas cadeias laterais imidazólicas, ter afinidade química por níquel. A proteína Lc9 foi recuperada a partir da eluição da coluna de afinidade com uma solução tampão contendo imidazol 500 mM tendo em vista esta substância, presente na cadeia lateral da histidina, prover o deslocamento da proteína alvo por competição (GE Healthcare, 2000). De acordo com a seqüência de aminoácidos fornecida pelo Dr. Geraldo Gileno (CPqGM) a Lc9 apresenta um peso molecular estimado de 44.000 (SDS-PAGE), valor próximo daquele estimado neste trabalho na média de 46.000 por idêntica técnica. Tal resultado é significativo levando em consideração que o erro do referido método eletroforético é de até 10 %, desde que não estejam envolvidas proteínas ou polipeptídeos com grupamentos prostéticos (glicoproteínas e outras), proteínas com pI em pH muito extremos, ou ainda apresentando pesos moleculares muito baixos (Silva Jr., 2001). A necessidade do uso de uma outra técnica comparativa para a purificação da proteína Lc9 foi ditada pela ainda considerável heterogeneidade protéica da preparação desta macromolécula isolada por cromatografia de afinidade. No caso, a propriedade desta proteína ser eluída na cromatografia de filtração em gel logo após o volume de exclusão da coluna de Superdex-200, deu margem a uma melhor separação dela de outras proteínas contidas na referida preparação. A análise eletroforética (SDS-PAGE) subsequente é indicativa que a segunda etapa de purificação

foi eficiente desde que a complexidade polipeptídica da preparação agora obtida diminuiu, ou melhor, a homogeneidade de Lc9 passou a ser mais significativa conforme pode ser demonstrado pela análise comparativa entre os perfis eletroforéticos concernentes às raias 3 (após IMAC) e 4 (após IMAC+SEC) da figura 4.7. Inclusive a aplicação na eletroforese desnaturante (Figura 4.8) de quantidades variadas da fração Lc9, isolada após os dois estágios de purificação, serve para demonstrar a apreciável homogeneidade da proteína isolada. Assim, a preparação de Lc9 proveniente dos dois passos cromatográficos seguidos foi usada nos estudos sorológicos por ELISA.

De acordo com o trabalho inicial sobre a Lc13, feito pelo grupo do CPqGM- FIOCRUZ, a mesma apresenta-se como corpo de inclusão e sua seqüência foi inserida no plasmídeo pBK-CMV, o qual não possibilita a expressão de uma cauda de histidina. Deste modo o processo de extração e purificação deste antígeno recombinante seguiu metodologia distinta daquele usado para a Lc9. Assim, após a ruptura celular, a proteína Lc13, teve seu *pellet* de expressão tratado com uma solução tampão contendo uréia 8M, como sugerido pela metodologia afim, já que a mencionada proteína recombinante apresenta-se insolubilizada. Foi realizado então, um teste de localização (solúvel e/ou insolubilizada) da proteína alvo, por intermédio da eletroforese desnaturante (Figura 4.14). Neste caso foi possível demonstrar-se que a proteína Lc13 estava no material solúvel proveniente do tratamento com o agente caotrópico.

Antes da etapa de purificação cromatográfica da Lc13, foi realizada uma diálise em solução tampão Tris HCl 10 mM visando a retirada de uréia. Tal retirada do agente caotrópico causou uma nova insolubilização da proteína Lc13. Desta forma a purificação cromatográfica da Lc13, na forma solúvel, só foi conseguida na presença de uréia.

A primeira opção de purificação em uma coluna POROS HQ foi referendada pelo significativo poder de resolução protéica da cromatografia acelerada de troca iônica por perfusão quando usa como desenvolvedor da coluna um sistema de eluição baseado em um gradiente salino (Silva Jr., 2004). Neste caso, a Lc13 foi eluída com solução tampão Tris HCl 50mM NaCl 1M contendo uréia 4M pH8.0, a fim de manter a proteína em estado solúvel. A verificação da homogeneidade da fração Lc13 isolada por cromatografia de troca aniônica feita por eletroforese desnaturante na presença de tricina (Figura 4.16), demonstrou uma melhoria na purificação da proteína (comparar figura 4.16, raias 2-5 com figura 4.14, raia 3). A atual homogeneidade foi considerada satisfatória para os fins desejados.

5.2- Caracterização das proteínas recombinantes

A focalização isoelétrica determina o ponto isoelétrico de uma proteína. Nesta técnica eletroforética as proteínas migram até encontrar um pH no meio eletroforético que seja correspondente ao seu ponto isoelétrico (Silva Jr., 2001).

A determinação do ponto isoelétrico da Lc9 feita por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida, indicou dois valores (pI 6,43 e 3,99) resultantes de duas bandas eletroforéticas significativas observadas. Assumindo-se a seqüência de aminoácidos da proteína em questão, obtida através do registro de patente destas proteínas, fornecida pelo CPqGM/FIOCRUZ, sem levar em conta aspectos conformacionais da mesma e, neste contexto, usando o programa computacional Expasy / Protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foi encontrado um pI da ordem de 5,57. Isto sugere que a banda eletroforética (pI 6,43) deve ser relativa a proteína Lc9. A outra banda eletroforética observada (pI 3,99) pode ser decorrente de um contaminante protéico, ou, até mesmo, um artefato eletroforético, tendo em vista que Lc9 analisada por dois outros métodos eletroforéticos (SDS-PAGE e *Western Blot*), mostrou sempre uma banda principal de PM estimado por SDS-PAGE de 43.000 e outra banda bem fraca por ambas eletroforeses, sugestivo de uma ligeira contaminação protéica na preparação final de Lc9. Cumpre ressaltar que, afora o *Western blot*, a revelação para as duas outras eletroforeses (IEF – PAGE e SDS-PAGE) empregou o mesmo corante *coomassie brilliant blue* como revelador de bandas protéicas.

No caso da proteína Lc13 somente uma banda eletroforética de pI igual a 6,42 foi observada na focalização isoelétrica. No caso este pI não está muito distante do cálculo teórico do pI (pI 5,63) feito para este antígeno usando o mesmo programa computacional acima e levando em conta as mesmas considerações feitas anteriormente, só que agora para a Lc13.

A cromatografia de exclusão e peneiração molecular é um tipo de cromatografia líquida onde os solutos são separados em função do binômio forma - peso molecular. Desta maneira, permite estimar o peso molecular de uma amostra protéica, a partir da construção de uma curva de calibração de PM e pode ser usada após o primeiro passo purificativo (Pessoa Jr. e Kilikian, 2005; Silva Jr., 2004).

Pela cromatografia de exclusão e peneiração molecular, uma técnica não desnaturante diferente do SDS-PAGE, o peso molecular da fração protéica Lc9 purificada mostrou um valor aproximado de 550000. Provavelmente, porque em sua forma nativa, a Lc9 deve apresentar-se em uma forma multimérica. Tal fato é comum a muitas proteínas, servindo como exemplo o caso

da proteína enzimática aldolase que apresenta uma única cadeia polipeptídica de peso molecular estimado por SDS-PAGE de 38000, enquanto por cromatografia de exclusão e filtração molecular seu PM é da ordem de 155000, desde que na sua forma nativa ela é um “tetrâmero” contendo quatro subunidades protéicas ou cadeias polipeptídicas idênticas (Davison, 1968). A determinação do peso molecular para a fração protéica Lc13 purificada mostrou um valor aproximado de 282.000, também por cromatografia de exclusão e peneiração molecular. A princípio, baseando-se nestes valores pode-se deduzir, que a Lc9 possui, aproximadamente, 12 subunidades ou cadeias polipeptídicas, já que seu peso molecular determinado por SDS-PAGE foi de 44000. Da mesma forma, a Lc13 (PM 88000 por SDS-PAGE) possuiria cerca de 3 subunidades.

Os resultados obtidos por *Western Blot* evidenciaram que as proteínas recombinantes Lc9 e Lc13 foram reativas ao anticorpo anti-leishmania, usando como meio a detecção eletroforética. Em ambos os casos, duas bandas eletroforéticas foram reveladas imunologicamente, sendo uma delas de maior intensidade tanto para a Lc9 como para a Lc13. A visualização destas duas bandas sugere uma degradação por hidrólise (proteases), o que pode ter ocorrido pelo degelo das amostras. A fim de comprovar tal fato, poderia ser sugerido a realização de um teste de estabilidade de tais proteínas recombinantes. No entanto, a banda principal revelada, constatou ser os polipeptídeos relacionados a cada proteína devido à equivalência das bandas reveladas por corante (SDS-PAGE) ou imunologicamente (*western blot*).

Os métodos eletroforéticos aqui usados serviram também como meios de se constatar o grau de pureza ou a homogeneidade das preparações protéicas finais isoladas de ambos antígenos, Lc9 e Lc13. Neste contexto, pode-se argumentar a favor da considerável pureza de ambas preparações protéicas, o que valida os métodos empregados em seus isolamentos.

5.3- Ensaio imunológico (ELISA)

O teste de ELISA apresenta uma ótima alternativa no diagnóstico da leishmaniose canina, devido a sua facilidade de padronização, possibilidade de diagnóstico em grande escala, melhor leitura e interpretação dos resultados quando comparados com outros testes sorológicos. No entanto, a sensibilidade e a especificidade do teste dependem diretamente do tipo de antígeno utilizado (Boarino, *et al.* 2008). Os testes de ELISA, que utilizam antígenos brutos, apresentam muitas limitações devido aos parâmetros sensibilidade e especificidade (Gontijo e Melo, 2004). Neste trabalho foi utilizado uma variante da técnica de ELISA denominada ELISA-indireto, que

prevê a captura antigênica seguida da reação com anticorpo específico. A reação é revelada através do uso de um segundo anticorpo marcado com uma enzima (peroxidase) dirigido contra o primeiro anticorpo presente no soro positivo (anticorpos de cão para *L. chagasi*). No caso a ação da oxidorreductase, sobre o substrato água oxigenada adicionado, gera oxigênio que por sua vez oxida um segundo composto presente no meio reacional (TMB) conduzindo-o do estado incolor para o estado colorido (azul), que, finalmente, em meio ácido forte apresenta-se de cor amarela. Tal técnica permite a discriminação qualitativa das amostras (positivo/negativo), pois na ausência de anticorpos contra as proteínas Lc9 e Lc13 no soro em teste, não há reatividade devido à lavagem das espécies químicas não fixadas. A utilização de antígenos recombinantes específicos do gênero *Leishmania*, ensejam uma melhoria na sensibilidade e na especificidade do ELISA, fatores determinantes da escolha desta técnica como mais um teste consistente no propósito do diagnóstico da leishmaniose em questão (Alves e Belvilacqua, 2004).

A padronização inicial do ELISA com antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* (Lc9 e Lc13) contou com a utilização de dois soros controles, sabidamente, um soro positivo e outro soro negativo, segundo análises parasitológica, clínica e sorológica (RIFI e ELISA com lisado bruto do parasito). Deste modo, pôde-se estabelecer as melhores condições de reatividade no ELISA em função de um compromisso entre a concentração do antígeno (300 ng) a ser fixada e a diluição do conjugado (1:10000 v/v para Lc9 e 1:20000 v/v para Lc13) (Figuras 4.19 – 4.22), tendo-se em conta que a diluição do soro canino foi, previamente, definida.

O índice de reatividade foi utilizado como uma forma de representar os resultados por servir para harmonizar as leituras de absorvâncias obtidas. Ele foi calculado através da relação entre as leituras de absorvâncias obtidas das amostras séricas testadas pelo valor da linha de corte (*cut-off*) estimada. O *cut-off* é um valor de corte do teste, sendo calculado a partir da média dos valores negativos. Para facilitar, adotamos um cálculo mais simples para ter um valor de *cut off* por placa, ou seja, um valor ajustado para cada reação da placa. A linha de corte foi estabelecida, utilizando-se um fator fixo de absorvância (0,200) acrescido da média das absorvâncias de cada amostra, funcionando como uma ferramenta para minimizar os resultados falsos positivos e falsos negativos, levando-se em conta eventuais diferenças de placa para placa do teste.

A sensibilidade do teste é dada pela porcentagem de positivos detectados pelo teste entre os indivíduos sabidamente doentes. A especificidade, pela porcentagem de negativos, entre indivíduos não doentes. Um resultado falso positivo acontece quando a amostra é sabidamente negativa, porém apresentou resultado positivo no teste. Já um resultado falso negativo acontece quando a amostra é sabidamente positiva, porém apresenta-se negativa no teste (Lira, 2005).

O desafio das proteínas alvo, Lc9 e Lc13, com o painel de soros caninos no ELISA, mostrou valores de índice de reatividade altos para alguns soros caracterizados como negativos (Figura 4.24), gerando alguns resultados falsos positivos. Estes resultados foram vistos com as mesmas amostras séricas, destacando-se três valores com maior discrepância entre os demais, tanto no ensaio com a Lc9 como no ensaio com a Lc13, indicando, assim, ser alguma característica presente no material sérico e não nos antígenos utilizados no ensaio.

A análise dos resultados do ELISA de cada proteína recombinante Lc9 e Lc13 evidenciou que, tanto em relação ao índice de sensibilidade (100% *versus* 95,7%) como de especificidade (95,0% *versus* 91,6%), os melhores resultados foram conseguidos para a primeira das duas supracitadas proteínas (Figuras 4.25 e 4.26). Uma das prováveis causas pode ser decorrente da preparação de Lc9, ser mais homogênea do que a preparação de Lc13. Desafortunadamente, tanto as eletroforeses desnaturantes (Figuras 4.8 e 4.16) assim como os resultados do *western blot* (Figuras 4.12 e 4.18) não foram suficientes para constatar tal hipótese. Em todas estas eletroforeses é percebido uma banda principal e um contaminante ou um pequeno número de contaminantes (Lc13, Figura 4.16, raia 2). O fato de Lc9 possuir um *tag* poliHis, ao contrário da Lc13, facilitou a sua purificação, sem levar em conta que um outro passo de purificação foi empregado para fornecer uma preparação deste antígeno mais homogênea. No caso de Lc13 pode ser sugerida a introdução de uma nova etapa de purificação a fim de se tentar obter uma preparação ainda mais homogênea na tentativa de melhorar os índices de sensibilidade e especificidade.

Os dados de sensibilidade e especificidade auferidos para os antígenos recombinantes Lc9 e Lc13 foram satisfatórios, ainda mais realçados para Lc9, uma vez que os atuais testes disponíveis no mercado com antígenos naturais (lisado do parasito) apresentam valores de especificidade e sensibilidade ligeiramente superiores a 90% conforme preconizado pelo Ministério da Saúde. Cumpre ressaltar ainda que, estudos realizados por Scalone, *et al.*, em 2002, com a proteína recombinante de *Leishmania*, o rK39 (uma kinesina, como a Lc9), em ELISA canino, mostrou índices de sensibilidade e especificidade de 97% e 98%, respectivamente, evidenciando assim que nossos resultados de sensibilidade e especificidade, principalmente os referentes a Lc9, estão condizentes com a literatura científica.

Os resultados apresentados nesta dissertação são sugestivos do uso, principalmente de Lc9, como um forte antígeno candidato ao desenvolvimento de um novo teste de ELISA para o imunodiagnóstico da leishmaniose canina. Não se exclui a possibilidade futura também, da análise imunológica de uma quimera (feita por manipulação genética), envolvendo ambos antígenos

quimicamente associados (Lc9-Lc13) no intuito de implementar um teste mais eficiente no diagnóstico da leishmaniose canina.

6 – CONCLUSÕES

Por fim, os estudos efetuados neste trabalho permitiram chegar a um diagnóstico conclusivo de que:

- 1 - Os processos de purificação utilizados permitiram obter preparações protéicas (Lc9 e Lc13) com homogeneidades adequadas ao ensaio imunológico proposto.
- 2 - A detecção imunológica dos antígenos (Lc9 e Lc13) pela técnica de *Western blot* (SDS-PAGE seguido de revelação imunológica) corroborou os dados obtidos, pela mesma técnica eletroforética, quando a revelação foi feita pelo corante *coomassie brilliant blue*.
- 3 - Os antígenos recombinantes são específicos de *Leishmania chagasi*.
- 4 - O antígeno Lc9 (sensibilidade 100%; especificidade 95%) apresentou melhores resultados que o antígeno Lc13 (sensibilidade 96%; especificidade 92%).
- 5 - Ambas proteínas recombinantes são potenciais antígenos alvo que podem ser usadas no desenvolvimento de ensaios sorológicos baseado em ELISA.

7 – PERSPECTIVAS

Como estudo futuro pretende-se:

- 1 - Avaliar o antígeno Lc9 em outros testes, tais como, o teste imunocromatográfico (teste rápido). Uma vez que o Lc9, apresenta-se como um forte candidato antigênico para ELISA.
- 2 - Sugerir a introdução de uma nova etapa de purificação para Lc13, a fim de se obter uma preparação mais homogênea, na tentativa de melhorar os índices de sensibilidade e especificidade.
- 3 - Outros antígenos recombinantes de *L. chagasi* ainda serão analisados e testados em diagnóstico para LV.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afrin F, Rajesh R, Anam K, Gopinath M, Pal S, Ali N. **Characterization of *Leishmania donovani* Antigens Encapsulated in Liposomes That Induce Protective Immunity in BALB/c Mice.** *Infection and immunity*, 2002; 70 (12): 6697–6706.

Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R, *et al.* **Intradermal Infection Model for Pathogenesis and Vaccine Studies of Murine Visceral Leishmaniasis.** *Infection and immunity*, 2003; 71: 401–410.

Alberts B. **Manipulação de proteínas, DNA e RNA. Biologia molecular da célula.** 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, *et al.* **Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy.** *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1994; 88(4): 371-378.

Alvar J, Canavate C, Guitiérrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, López-Vélez R, *et al.* **Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years.** *Clinical Microbiology Reviews*, 1997; 10:298-319.

Alves AW, Bevilacqua PD. **Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993 - 1997.** *Cadernos Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2004; 20 (1): 259-265.

Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, *et al.* **Comparison of the Polymerase Chain Reaction and Serology for the detection of canine visceral leishmaniasis.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995; 53 (3):251-255.

Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, *et al.* **RK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis.** *The Journal infectious diseases*, Chicago, 1996; 173: 758–761.

Balanco JMF. **Mimetismo apoptótico em *Leishmania sp*: papel na interação parasito/hospedeiro** [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo (USP); 2005.

Barker DC. **Molecular approaches to DNA diagnosis.** Parasitology, 1989; 99 (Suppl 1): 125-149.

Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeiky YA. **Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*.** Molecular and biochemical parasitology, Amsterdam, 1999; 102: 249–261.

Blackwell JM. **Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA.** Parasitology, 1992; 104: S19–S34.

Bisugo MC. **Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, Brasil. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39** [Dissertação]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2007.

Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R *et al.* **Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2005; 12(5): 647–653.

Boarino A, Bollo E, Prunotto L, Canale L, Uslenghi F, Poletti P **Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis.** Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 2008; 31(6):527-36.

Bos HJ, Van den Eijk AA. **Application of ELISA-enzyme linked Immunosorbent Assay in the serodiagnosis of amebiasis.** Transactions of the Royal Society of tropical Medicine na Hygiene, 1975; 69, 440.

Brandonisio O, Fumarola L, Maggi P, Cavaliere R, Spinelli R, Pastore G. **Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002; 21: 461-464.

Buchner J. **Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones.** FASEB J, 1996; 10: 10-19.

Bugg CE, Carson W, Montgomery JA. **Drugs by Design.** Scientific American, 1994; 269: 60-66.

Burns JM Jr., Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. **Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis.** Proc.Natl.Acad.Sci, 1993; 90: 775-779.

Cabreira MAA. **Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro-RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz; 1999.

Campos RM. **Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral** [Dissertação]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ; 2007.

Carlsson HE, Lindberg AA, Hammarstrom S. **Tritation of antibodies to *Salmonella O* antigen by enzyme-linked immunosorbent assay**. *Infection and Immunity*, 1972; 6: 703-708.

Carvalho EM, Bacelar O, Reed SG, Barral A, Rocha H. **Visceral leishmaniasis. A disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill *Leishmania***. *Braz J Med Biol Res*, 1988; 21: 85.

Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R, Dietze R. **Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of brasilian visceral leishmaniasis**. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2003; 68 (3): 321-324.

Chagas E. **Primeira verificação em indivíduo vivo de leishmaniose visceral no Brasil**. *Brasil med*, 1936; 50: 221.

Chagas E, Cunha AM. **Leishmaniose visceral americana**. *Mem Ist Oswaldo Cruz*, 1937; 32: 321.

Chakrabarty R, Mukherjee S, Lu HG, McGwire BS, Chang KP, Basu MK. **Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 and LPG)**. *The Journal of parasitology*, 1996; 82 (4): 632-635.

Chung CT, Niemela SL, Miller RH. **One step preparation of competent *Escherichia Coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution**. *Biochemistry*, 1989; 86: 2172-2175.

Cimermam B, Cimermam S. **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais**. 2ªed. Atheneu, São Paulo; 2002.

Cortada VM, Doval ME, Souza Lima MA, Oshiro ET, Meneses CR, Abreu-Silva AL, *et al.* **Canine visceral leishmaniosis in Anastacio, Mato Grosso do Sul state, Brazil.** *Vet Res Commun*, 2004; 28(5): 365-374.

Costa AC, Genaro O, Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick SMM, *et al.* **Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1991; 24 (1): 21-25.

Costa SR, D'Oliveira AJr, Bacellar O, Carvalho EM. **T Cell Response of Asymptomatic *Leishmania chagasi* Infected Subjects to Recombinant Leishmania Antigens.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1999; 94 (3): 367-370.

Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano NC. **A survey for cutaneous and visceral leishmaniasis among 1.342 dogs from areas in Rio de Janeiro where the human disease occurs.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1985; 80:17-22.

Cunha S, Freire M, Eulalio C, Cristovão J, Netto E, Johnson WD Jr *et al.* **Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995; 89 (2): 155-158.

Cunningham AC. **Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*.** *Experimental and Molecular Pathology*, 2002; (72): 132-141.

Cupolillo E, Grimald G Jr, Momen H. **A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994; 50: 296-311.

Davison PF. **Proteins in denaturing solvents: gel exclusion studies.** *Science*, 1968; 161(844): 906-907.

Deane LM, Deane MP. **Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em caso humano de leishmaniose visceral.** *Hospital Clínical*, 1954; 46: 487-489.

De Blas I, Ortega C, Frankena K, Noordhuizen J, Thrusfield M. **Programa de estatística: WIN EPISCOPE 2.0.** *Facultad de Veterinaria Zaragoza; Wageningen University, University of Edinburgh*, 2000.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. **Use of Molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania – a mini review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1994; 89 (3): 463-469.

Desjeux P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 2004; 27: 305–318.

Deutscher MP. **Guide to Protein Purification. Methods in enzymology.** Academic Press INC, Califórnia – EUA, 1990.

Donovan C. **On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India.** J Brasil Med, 1903; 2: 79.

Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. **Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes.** Biochim Biophys Acta, 1971; 251(3): 427-34.

Ferreira AW, Ávila SLM. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auro-Imunes.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Boletim Epidemiológico. Ano III:1-8.** Brasília, 1999. Disponível em : <www.funasa.gov.br>. Acessado em: 12/08/2005.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília, 2002. Disponível em: <www.funasa.gov.br>. Acessado em 12/08/2005.

GE Healthcare. **Hydrophobic Interaction Chromatography. Principles and Methods.** USA, 1993.

GE Healthcare. **Protein Purification Handbook.** USA, 1999.

GE Healthcare. **The Recombinant Protein Handbook. Protein Amplification and Simple Purification.** USA, 2000.

GE Healthcare. **Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods Handbook.** USA, 2002.

Goldstein LS, Philip AV. **The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization.** Review. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol, 1999; 15: 141-183.

Gontijo B, Carvalho MLR. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2003; 36(1): 71-80.

Gontijo CMF, Melo MN. **Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. Revista brasileira de epidemiologia, 2004; 7 (3): 338–349.

Gomes AC, Neves VFC. **Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 1998; 31 (6): 549-552.

Grevelink SA, Lerner EA. **Leishmaniasis**. J. Am. Acad. Dermatol, 1996; 34: 257.

Grimaldi Jr.G, Tesh RB. **Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research**. Clinical Microbiology Reviews, 1993; 6: 230–250.

Handman E. **Leishmaniasis: current Status of Vaccine Development**. Clinical Microbiology Reviews, 2001; 14 (2): 229–243.

Hartl FU, Hayer Hartl M. **Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein**. Science, 2002; 295: 1852–1858.

Hommel M. **Enzymoimmunoassay in leishmaniasis**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1976; 70: 15-16.

Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. **The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis**. Annals of tropical medicine and parasitology, 1978; 72 (3).

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/interna/desenvolvimento_tecno.htm. Acessado em: 05/07/07.

Invitrogen Life technologies. **pRSET A, B, and C For high-level expression of recombinant proteins in E. Coli**. Catalog nº V351-20.
Disponível em: http://www.bio.indiana.edu/~chenlab/potocols/prset_man.pdf. Acessado em 20/12/2007.

Jaffe CL, Zalis M. **Use of purified parasite proteins from Leishmania donovani for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis**. J Infect Dis, 1988; 157(6): 1212-1220.

Josephy PD, Eling T, Mason RP. **The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine.** The Journal of Biological Chemistry, 1982; 267(3): 3669-3675.
Kar K. **Serodiagnosis of leishmaniasis.** Crit Rev Microbiol, 1995; 21: 123-152.

Karlin S, Brocchieri L. **Heat Shock Protein 70 Family: Multiple Sequence Comparisons, Function, and Evolution.** Journal of molecular evolution, 1998; 47: 565-577.

Kiang JG, Tsokos GC. **Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology.** Pharmacology and therapeutics, 1998; 80 (2): 183-201.

Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. **Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis.** Clin.Diagn.Lab Immunol, 2001; 8: 1220-1224.

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4.** Nature, 1970; 227: 680-685.

Lainson R, Shaw JJ. **Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in Biology and Medicine.** Biology and Epidemiology. Academic Press Inc, 1987; 1: 1-120.

Lainson R, Shaw WJJ. **A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil.** J Braz Assoc Adv Sci, 1992; 44 (2/3): 94-106.

Leishmania Facts, 2006. Disponível em:

<<http://www.susanamendez.com/LeishmaniaFacts/LifeCicle.html>>. Acesso em: 04 jul. 2007.

Lira RA. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI Leishmaniose- Visceral-Canina-Bio-Manguinhos** [Dissertação]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz; 2005.

Martins DRA, Jeronimo SMB, Donelson JE, Wilson ME. ***Leishmania chagasi* T-Cell Antigens Identified through a Double Library Screen.** Infection and immunity, 2006; 74 (12): 6940-6948.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR. **Leishmaniose Visceral (Calazar).** Jornal Brasileiro de Medicina, 1981; 41 (5): 61-84.

Marzochi MCA. **Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares**. J Bras Med, 1992; 63: 82-104.

Mauel J. **Macrophages-parasite interactions in *Leishmania* infections**. J Leuk Biol, 1990; 47:187-193.

Miller MA, McGowan SE, Gantt KR, Champion M, Novick SL, Andersen KA, *et al.* **Inducible Resistance to Oxidant Stress in the Protozoan *Leishmania chagasi***. The Journal of biological chemistry, 2000; 275 (43): 33883–33889.

Ministério da saúde do Brasil. Secretária de vigilância em saúde. **Leishmaniose visceral: Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 6ª edição; 2005.

Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de informação de agravos de notificação e base populacional do IBGE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília (DF); 2006.

Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT. **Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 2005; 38 (2): 147-152.

Moraes RG. **Parasitologia & Micologia Humana**. 4ªed, Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2000.

Murray, HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. **Advances in leishmaniasis**. Lancet, 2005; 366: 1561–1577.

Nakane PK, Kawaoi A. **Peroxidase – labeled antibody a new method of conjugation**. The journal of histochemistry and cytochemistry, 1974; 22 (12): 1084-1091.

Nascimento AAC, Espreafico EM, Paçó ML, Monesi N, Martinez RNM, Rodrigues V. **Tecnologia do DNA Recombinante** [apostila]. São Paulo: Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2007.
Disponível em: morpheus.fmrp.usp.br/td/download_apostila.php. Acessado em 22/11/07.

Neves DP. **Parasitologia dinâmica**. São Paulo: Atheneu; 2005.

Oliveira MP. **Estudo do perfil de citosinas em pacientes com leishmaniose tegumentar americana** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ; 1996.

Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jerônimo SM, Bezerra G, Soto M, Alonso C, Carvalho EM. **Recombinant *leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis.** Clin Diagn Lab Immuno, 2005; 12 (10): 1164-1167.

Perez - Alvarez MJ Larreta R, Alonso C, Requena JM. **Characterisation of a monoclonal antibody recognising specifically the HSP70 from Leishmania.** Parasitology research, 2001; 87 (11): 907–910.

Pessoa Jr. A, Kilikian BV. **Purificação de produtos biotecnológicos.** São Paulo: Manole; 2005.

Pessoa SB, Barreto MP. **Leishmaniose tegumentar americana.** Rio de Janeiro: Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação; 1948.

Pessoa SB. **Parasitologia Médica.** 11ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

Peterson GL. **Determination of total protein. In Methods in Enzymology.** Enzyme Structure - Part I, 1983; 91 (12): 95-105.

Presentini R, Terrana B. **Influence of the antibody-peroxidase coupling methods on the conjugate stability and on the methodologies for the preservation of the activity in time.** Journal of Immunoassay, 1995; 16 (3): 309-324.

Price VL, Kieny MP. **Vaccines for Parasitic Diseases.** Current drug targets, 2001; 1: 315–324.

Qiagen. **A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.** 5ª ed, 2003.

Rey L. **Parasitologia.** 3ªed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Rey L. **Parasitologia.** 2ªed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

Rittig MG, Bogda C. **Leishmania-action: complexities and alternative views.** Parasitology Today, 2000; 16: 292-297.

Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller, Kipngetch S, Davidson R. **Evaluations of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis.** The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2006; 74 (1): 76–80.

Roach TIA, Kiderlen AF, Blackwell JM. **Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha in killing *Leishmania donovani* amastigotes in gamma-interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages.** Infect. Immunon, 1991; 59: 3935-3944.

Roberts SC, Wilson ME, Donelson JE. **Developmentally regulated expression of a novel 59-KDA product of the major surface gene family of *Leishmania chagasi*.** J Biol Chem, 1995; 270: 8884-8892.

Rodgers MR, Popper JM, Wirth DF. **Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection diagnosis of *Leishmania*.** Experimental Parasitology, 1990; 71: 267-275.

Rodriguez N. **Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación con el desarrollo de la leishmaniasis.** Dermatología Venezolana; 2003, 41 (3): 3-9.

Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, Gradoni L. **Prokariotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis.** Clinical and diagnostic laboratory immunology, 2003; 10 (6): 1153.

Sabroza PC. **O domicílio como fator de risco na leishmaniose tegumentar americana. Estudo epidemiológico em Jacarepaguá, município do Rio de Janeiro** [Tese]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ; 1981.

Sambrook JEF, Maniatis T. **Molecular cloning. A laboratory manual.** 2^a ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sambrook JEF, Russel DW. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** 3^aed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,; 2001.

Scalone A, Luna RD, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, *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, 2002; 104: 275-285.

Schägger H, Von Jagow G. **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa.** Analytical Biochem, 1987; 166: 368-379.

Silva Jr. JG. **Eletroforese de proteínas. Guia teórico e prático.** Rio de Janeiro: Interciência; 2001.

Silva Jr. JG. **Cromatografia de Proteínas. Guia teórico e prático.** Rio de Janeiro: Interciência; 2004.

Soares DF. Aspectos **Celulares e Imunológicos das manifestações clínicas na co-infecção por leishmania/HIV-1** [Monografia]. Rio de Janeiro: Universidade Veiga de Almeida; 2005.

Stratagene Products Division – Agilent Technologies. **Instruction manual: pBK-CMV phagemid vector.** Catalog nº 212209.

Disponível em: <http://www.stratagene.com/manuals/212209.pdf>. Acessado em: 05/01/2009.

Soussi N, Milon G, Colle JH, Mougneau E, Glaichenhaus N, Goossens PL. **Listeria monocytogenes as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen in Leishmania major.** Infection and immunity, 2000; 68 (3): 1498–1506.

Souza CSF. **Modelo murino para infecção subcutânea com Leishmania (Leishmania) chagasi: Aspectos clínico, imunoparasitológico e histopatológico** [Tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ; 2002.

Sundar S, Singh RK, Maurya R, Kumar B, Chhabra A, Singh V, Rai M. **Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test.** Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006; 100: 533-537.

Superintendência de controle de endemias (SUCEN). **Leishmaniose Visceral.** Brasília, 2007. Disponível em: www.sucen.sp.gov.br/.../texto_leish_visc_pro.htm. Acessado em: 30/11/2007.

Towbin H, Staechelin T, Gordon J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci, 1979; 76: 4350-4.

Turk JL, Bryceson ADM. **Immunological phenomena in leprosy and related diseases.** Adv. Immun, 1971; 13: 209.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). **Atlas de imagens.** Disponível em: www.ufrgs.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm – Acesso em 04/08/2005.

Voller A, Bidwell DE, Huldt G, Engvall E. **A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria.** Bull World Health Organ, 1974; 51(2): 209-211.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. **A serological study on human *Trypanosoma rhodesiense* infections using a microscale enzyme-linked immunosorbent assay.** Tropenmedizin und Parasitologie, 1975a; 26: 247-251.

Voller A, Drape CC, Bidwell DE, Bartlett A. **Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease.** Lancet, 1975b; I: 426-428.

Voller A, Bidwell DE. **Enzyme immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination.** British Journal of Experimental Pathology, 1976a; 57: 243-248.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B. **A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody.** Journal of Clinical Pathology, 1976b; 29: 150-153.

White Jr. AC, McMahon-Pratt D. **Purification and Characterization of an 80- Kilodalton Membrane Protein from *Leishmania donovani*.** Infection and immunity, 1988; 56 (9): 2385-2391.

World Health Organization (WHO). **Essential leishmaniasis maps.** Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html>. Acesso em: 04/11/2007.

World Health Organization (WHO). **Control of the leishmaniasis. Executive board.** 118th Session, Provisional agenda item 5.1; 2006. Disponível em: <www.emro.who.int/afghanistan/Media/PDF/Leishmaniasis_EB118_4.pdf>. Acesso em: 25/10/2007.

World Health Organization (WHO). **Tropical Diseases Research (TDR). Strategic Direction for Research: Leishmaniasis.** Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; 2002.

Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>>. Acesso em: 19/10/2007.

World Health Organization (WHO). **Manual on Visceral Leishmaniasis Control.** Division of Control of Tropical Diseases, Geneva; 1996.

Zaverucha TV. **Vacinação murina com frações subcelulares de *Leishmania amazonensis* sob modulação de *Mycobacterium Bovis* BCG e ciclossfosfamida** [Tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ; 2005.

Zerpa O, Ulrich M, Borges R, Rodríguez V, Centeno M, Negrón E. **Epidemiological and Immunological Aspects of Human Visceral Leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela.** Memórias do instituto Oswaldo Cruz, 2003; 97 (8): 1079–1083.

Zurita AI, Rodríguez J, Piñero JE, Pacheco R, Carmelo E, del Castillo A, *et al.* **Cloning and Characterization of the *Leishmania (Viannia) Braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513–663).** Journal of parasitology, 2003; 89 (2): 372–378.